

ANA RITA ARAÚJO SILVA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO MICRORNA-146a EM MURGANHOS TRANSGÊNICOS K14-HPV16

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Oncologia submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Doutor Rui M. Gil da Costa

Categoria – Investigador de pós-doutoramento

Afiliação – LEPABE, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto e Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, CI-IPOP, Instituto Português de Oncologia do Porto

Co-Orientador- Professor Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva

Categoria – Professor Associado com Agregação da Universidade Fernando Pessoa

Afiliação - Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do IPO-Porto

Co-Orientador –Mestre Sara dos Santos Teixeira da Silva

Afiliação- Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do IPO-Porto, CI-IPOP

INFORMAÇÃO TÉCNICA

TÍTULO:

Análise da expressão de microRNA-146a em murganhos transgênicos K14-HPV16

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Oncologia, Especialização em Oncologia Molecular, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

AUTOR:

Ana Rita Araújo Silva

DATA:

Setembro de 2016

E-MAIL:

rita.arasilva@gmail.com

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração e a boa vontade daqueles a que agora me refiro. A todos os meus sinceros agradecimentos!

Ao Prof. Doutor Rui Medeiros e ao Doutor Gil da Costa, agradeço por toda ajuda, apoio e atenção que sempre me dispensaram, pela disponibilidade, por todas as críticas construtivas e pela orientação ao longo da elaboração desta tese.

À Sara Silva e à Mara Fernandes agradeço todo o apoio e prontidão em ajudar ao longo da realização desta tese.

À Prof. Paula Oliveira, ao Carlos Santos, Tiago Neto, André Santos e todo o pessoal do biotério da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro pela disponibilidade e pela amabilidade com que nos receberam no biotério.

Aos meus pais, agradeço por serem portos de abrigo nas alturas em que quis desistir, por nunca me terem deixado fazê-lo e por terem sempre acreditado em mim.

Ao meu porto seguro e o meu maior suporte emocional, que me incentivou sempre a continuar. Obrigada pela paciência!

Depois, sem querer deixar hierarquias definidas, agradeço em geral aos meus colegas de curso pelos bons momentos passados, as partilhas feitas nas aulas e também fora delas.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível”.

- São Francisco de Assis

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

bFGF - *Basic fibroblast growth factor*
CIN - *Cervical intraepithelial neoplasia*
CIS - *Carcinoma in situ*
Ct - *Cycle Threshold*
CRPV - *Cottontail Rabbit Papillomavirus*
DGCR8 - *DiGeorge Syndrome chromosomal region 8*
DNA - *Deoxyribonucleic acid*
dNTPs - *Deoxynucleotide Triphosphates*
EBV - *Epstein-Barr Virus*
HBV- *Hepatitis B Virus*
HCV - *Hepatitis C Virus*
HPV - *Papilomavírus Humano*
HTLV - *Human T-cell lymphocytic virus*
IL - *Interleucina*
I κ B - *inhibitor of kappa B*
IRAK1- *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*
K14 - *Citoqueratina 14*
KSHV- *Kaposi's Sarcoma Herpes Virus*
L - *Late*
LCR - *Long Control Region*
miRNA - *microRNA*
MMTV - *Mouse Mammary Tumor Virus*
mRNA - *RNA mensageiro*
NF- κ B - *nuclear factor NF- κ B*
NMSC - *Non Melanoma Skin Cancer*
Nts - *Nucleótidos*
ORF - *Open Reading Frame*
Pb - *Pares de base*
PCR - *Reação em cadeia da polimerase*

qRT-PCR – RT-PCR em tempo real
RB - Retinoblastoma
RISC – *RNA induced silencing complex*
RNA – *Ribonucleic acid*
RSV- *Rous Sarcoma Virus*
SCC- *Squamous cell carcinoma*
TAR- *HIV-1 transactivating response*
TLR- *Toll-like receptor*
TNF- *Tumor necrosis factor*
TRAF6- TNF receptor associated factor 6
TRBP – *TAR RNA-binding protein*
UTR – *Untranslated Region*
UV – Ultra-Violeta
VEGF -*Vascular endotelial growth factor*

Em Portugal, o cancro do colo-do-útero é o mais comum dos cancros do sistema reprodutor feminino e representa cerca de 4% de todos os cancros nas mulheres. A infeção persistente por HPV é a principal causa de cancro no colo-do-útero e a probabilidade de uma mulher ser infetada por HPV durante a sua vida de é de 80-90% e em 5-10% das mulheres infetadas, a infeção pode persistir e progredir para cancro.

Os microRNAs são pequenos RNAs não codificantes capazes de regular a expressão de genes em nível pós-transcricional. Um número crescente de estudos demonstra que os microRNAs desempenham papel importante na carcinogénese. Estudos recentes sugerem que o miR-146a desempenha um papel importante na carcinogénese mediada por HPV devido à sua interação em importantes vias de sinalização.

Na realização deste trabalho foram utilizados 91 murganhos transgénicos K14-HPV16 com diferentes idades que expressam genes da região early do HPV16 (E6, E7, E1, E2, E4, E5) em células basais do epitélio queratinizado. A 9 murganhos foi administrado o anti-inflamatório celecoxib e a 11 murganhos foi administrado o anti-inflamatório DMAPT (dimetilaminopartenolídeo).

Os resultados obtidos neste estudo indicam que os níveis de expressão de mir-146a são superiores em murganhos transgénicos (HPV^{+/+}) comparativamente com murganhos *wild-type* (HPV^{-/-}) ($p=0,011$). Os resultados revelaram ainda um aumento significativo ($p=0,036$) na expressão do miR-146a em lesões cutâneas displásicas de murganhos transgénicos de 28-30 semanas comparando com as lesões predominantemente hiperplásicas de murganhos transgénicos de 24-26 semanas. Em amostras que manifestaram CIS verificamos diminuição significativa da expressão do miR-146a.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram um aumento significativo na expressão do miR-146a em murganhos transgénicos tratados com fármacos anti-inflamatórios (celecoxib e DMAPT) em comparação com murganhos transgénicos que não receberam tratamento.

Os resultados obtidos na comparação da expressão do miR-146a entre murganhos transgénicos e *wild-type* sugerem que existe sobre-expressão do mir-146a em murganhos transgénicos numa fase inicial da carcinogénese, promovendo a proliferação celular. A diminuição da expressão do miR-146a

numa fase mais avançada da carcinogénese sugere controlo pelo HPV16, promovendo invasão e metastização.

ABSTRACT

In Portugal, cervical cancer is the most common of the female reproductive system cancers and represents about 4% of all cancers in women. Persistent HPV infection is the leading cause of cervical cancer and the likelihood of a woman to be infected with HPV during her life is 80-90% and in 5-10% of infected women the infection may persist and progress to cancer.

MicroRNAs are small non-coding RNAs capable of regulating gene expression at a post-transcriptional level. A growing number of studies show that miRNAs play a role in carcinogenesis. Recent studies suggest that miR-146a plays an important role in HPV-mediated carcinogenesis due to its role in important signaling pathways.

For this project 91 K14-HPV16 transgenic mice of different ages were used. These mice express genes of the early region of HPV16 (E6, E7, E1, E2, E4, E5) in basal cells of keratinized epithelium. Two anti-inflammatory drugs were tested, celecoxib and dimethylaminoparthenolide (DMAPT). Celecoxib was administered to 9 mice and DMAPT was administered to 11 mice.

The results of this study indicate that miR-146a expression levels were higher in transgenic mice (HPV^{+/+}) mice compared to wild-type (HPV^{-/-}) ($p=0.011$). The results also showed a significant increase ($p=0.036$) in the miR-146a expression in dysplastic skin lesions of transgenic mice of 28-30 weeks compared with hyperplastic lesions found in 24-26 weeks transgenic mice. In samples demonstrating CIS we found a significant decrease in miR-146a expression.

The results obtained in this study demonstrated a significant increase in miR-146a expression in transgenic mice treated with anti-inflammatory drugs (celecoxib and dimethylaminoparthenolide) compared to transgenic mice of the same age who received no treatment.

The data obtained in comparing the miR-146a expression from transgenic mice and wild-type suggest that overexpression of miR-146a in transgenic mice at an early stage of carcinogenesis may promote cell proliferation. Decreased miR-146a expression at a later stage of carcinogenesis suggests HPV16 control in order to promote invasion and metastasis.

ÍNDICE GERAL

Abreviaturas e Símbolos	I
Resumo	VII
Abstract	IX
Índice de Ilustrações.....	XIII
Índice de Tabelas	XV
 Capítulo I: Introdução.....	 1
1. Cancro	3
1.1 Vírus e Cancro	3
2. O Papilomavírus Humano (HPV).....	5
2.1 Genoma.....	6
2.2 Proteínas virais.....	7
2.3 Ciclo de vida do HPV.....	9
3. Cancro do Colo-do-Útero	11
3.1 História natural do cancro do colo-do-útero.....	12
4. MicroRNAs.....	13
4.1 MicroRNAs e Cancro	14
4.2 Os miRNAs e HPV.....	15
4.3 miR-146a	16
5. Murganhos K14-HPV16.....	19
 Capítulo II: Objetivos	 21
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
 Capítulo III: Materiais E Métodos	 25
1. Murganhos transgênicos K14-HPV16.....	27

2. Desenho experimental.....	27
3. Colheita das amostras	28
4. Genotipagem: HPV16-E6 e HPV16-E2.....	28
5. Análise histológica	29
6. Análise de expressão do miR-146a	29
6.1 PCR em tempo real.....	29
6.2 Quantificação e análise estatística	30
Capítulo IV: Resultados	31
1. Análise macroscópica	33
2. Análise histológica	33
3. Análise da expressão do mir-146a.....	35
3.1.Murganhos transgênicos <i>versus</i> murganhos <i>wild-type</i>	35
3.2.Expressão do miR-146a em diferentes lesões induzidas pelo HPV16.....	36
4. Análise do efeito de anti-inflamatórios na expressão do miR-146a.....	39
4.1.Celecoxib.....	39
4.2.DMAPT.....	40
Capítulo V: Discussão	41
1. Análise da expressão do miR-146a.....	45
1.1 Murganhos transgênicos <i>versus</i> murganhos <i>wild-type</i>	45
1.2 Influência da progressão das lesões pré-neoplásicas.....	46
2. Efeitos de fármacos anti-inflamatórios.....	49
2.1 Efeito do celecoxib sobre a expressão do miR-146a.....	49
2.2 Efeito do DMAPT sobre a expressão do miR-146a.....	51
3. Discussão geral	53
Capítulo VI: Conclusões E Perspetivas Futuras	55
Capítulo VII: Referencias Bibliográficas	59

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração representativa do genoma HPV	7
Figura 2 - Ilustração da biogénese de miRNAs	4
Figura 3 - Ilustração do <i>loop</i> de <i>feedback</i> negativo onde participa o miR-146a	4
Figura 4 - Análise macroscópica de murganhos wild-type (HPV-/-) e transgénicos (HPV16 +/-).	33
Figura 5 - Análise histológica de murganhos <i>wild-type</i> e murganhos transgénicos.	33
Figura 6 - Expressão relativa normalizada do miR-146a em murganhos wild-type (HPV16 -/-) e em murganhos transgénicos (HPV16 +/-).	35
Figura 7 - Expressão relativa normalizada do miR-146a em murganhos transgénicos de 24-26 semanas e 28-30 semanas.	36
Figura 8 - Expressão relativa normalizada do miR-146a em murganhos transgénicos com diferentes lesões induzidas pelo HPV16.	37
Figura 9 - Expressão relativa normalizada do miR-146a em amostras de pele de peito e pele de orelha de murganhos <i>wild-type</i>	38
Figura 10 - Expressão relativa normalizada do miR-146a em murganhos transgénicos que não receberam tratamento e em murganhos transgénicos que receberam tratamento com celecoxib 75 mg/Kg/dia.	39
Figura 11 - Expressão relativa normalizada do miR-146a em murganhos transgénicos que não receberam tratamento e em murganhos transgénicos que receberam tratamento com DMAPT 100 mg/Kg/dia.	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Oncovírus descobertos em humanos, a sua taxonomia, genoma e cancro ao qual se encontra associado.....	4
Tabela 2 - Associação entre a idade, genótipo e tratamento em cada grupo de murganhos em estudo.....	3
Tabela 3 - Análise histológica dos grupos de murganhos.	33

Capítulo I: Introdução

1. Cancro

O cancro é conhecido há vários séculos tratando-se de um crescimento celular aberrante e descontrolado capaz de invadir tecidos adjacentes e à distancia (Cooper, 2000). O desenvolvimento de cancro deve-se à acumulação de mutações espontâneas ou induzidas capazes de escapar aos mecanismos de controlo celular possibilitando a reprodução de células resistentes à apoptose (Alberts *et al.*, 2002).

Embora o desenvolvimento de novos meios de diagnóstico e terapias tenham diminuído a taxa de mortalidade por cancro, este continua a ser uma das principais causas de morte nos países industrializados. Apenas 5-10% dos cancros são causados diretamente por herança de mutações germinativas ou somáticas. Os restantes 90-95% estão associados aos estilos de vida e condições ambientais (Anand *et al.*, 2008).

1.1. Vírus e Cancro

A associação de vírus e cancro tem sido explorada há várias décadas e embora exista uma clara associação entre diversos vírus com diferentes processos de carcinogénese, são poucos os vírus que apresentam evidência de causa-efeito. Mundialmente, os vírus são responsáveis por aproximadamente 20% de todas as formas de cancro em humanos (zur Hausen, 2009).

A descoberta do primeiro vírus causador de cancro, ou oncovírus foi creditada a Peyton Rous, que identificou o RSV (vírus do sarcoma de Rous) em sarcomas presentes em galinhas (Rous, 1911). Em 1933, Richard Shope descobriu o primeiro oncovírus em mamíferos, o CRPV (*Cottontail Rabbit Papillomavirus*) capaz de infetar coelhos do género *Sylvilagus* e em 1936 John Bittner descobriu o MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*) que era transmitido de mães para crias pelo leite (Shope e Hurst, 1933; Bittner 1936). Com a descoberta de cada vez mais oncovírus, a possibilidade de existirem vírus como etiologia principal de cancros humanos foi aumentando e a descoberta dos primeiros oncovírus humanos tomou início na década de 60 com a descoberta do EBV (*Epstein-Barr Virus*) em linfomas de Burkitt (World Health Organization, 1969).

Contudo, o reconhecimento da relação de causalidade entre vírus e o desenvolvimento de cancro em humanos surgiu no início da década de 1980, devido a 3 grandes descobertas. Em 1983 e 1984, os papilomavírus humanos 16 e 18 foram isolados, pela primeira vez, em amostras de cancro do colo-do-útero

humanas (Durst *et al*, 1983; Boshart *et al*, 1984). Também no início da década de 80, um estudo epidemiológico de grande escala permitiu a associação entre infecção persistente com vírus da Hepatite B (*Hepatitis B Virus*) e desenvolvimento de cancro no fígado (Beasley R.P. *et al*, 1981). A terceira grande descoberta foi o isolamento do vírus linfotrópico de células T humano (HTLV-I) em doentes com linfomas e leucemias de células T (Poiesz,1980; Yoshida *et al*,1982). Desde os anos 80 foram descobertos ainda o HCV (*Hepatitis C Virus*) e o KSHV (*Kaposi's sarcoma herpes virus*) (tabela 1).

Tabela 1 - Oncovírus descobertos em humanos, a sua taxonomia, genoma e cancro ao qual se encontra associado.

Vírus	Taxonomia	Genoma	Cancro Humano
EBV	<i>Herpesviridae</i>	dsDNA, 172 kb ~90 ORFs	Carcinoma da nasofaringe, Linfomas, Linfoma de Burkitt, Linfoma de Hodgkin
HBV	<i>Hepadnaviridae</i>	dsDNA, 3.2 Kb 4 ORFs	Carcinoma Hepatocelular
HCV	<i>Flaviviridae</i>	DsRNA, 9.4 Kb 9 ORFs	Carcinoma Hepatocelular
HPV	<i>Papillomaviridae</i>	dsDNA, 8 Kb 8-10 ORFs	Cancro do colo-do-útero, Cancro de cabeça e pescoço, Cancro anogenital
HTLV-I	<i>Retroviridae</i>	dsRNA, 9 Kb 6 ORFs	Leucemia de células T do adulto
KSHV	<i>Herpesviridae</i>	dsDNA, 165kb ~90 ORFs	Sarcoma de Kaposi, Linfoma de efusão primária

2. O Papilomavírus Humano (HPV)

Os papilomavírus são vírus relativamente pequenos, sem envelope, de 55 nm de diâmetro que fazem parte da família *Papillomaviridae*, anteriormente *Papovaviridae*. São constituídos por DNA circular de cadeia dupla, com cerca de 17,900 pares de bases associados a histonas (Favre, 1975; Baker *et al.*, 1991). Atualmente, já foram identificados e sequenciados mais de 200 papilomavírus incluindo mais de 150 HPVs (Bernard *et al.*, 2010).

O papilomavírus humano (HPV) pode ser associado a uma grande variedade de condições clínicas que podem ir desde lesões inócuas até cancro. A infecção por HPV é considerada a doença sexualmente transmissível com maior prevalência no mundo (Roccio *et al.*, 2012)

Os HPVs dividem-se entre aqueles que podem infectar os queratinócitos da pele e aqueles com tropismo para as mucosas. Os primeiros atuam principalmente sobre a pele nas mãos e pés enquanto que os últimos podem afetar as mucosas da boca, garganta, trato respiratório e epitélio anogenital (Burd, 2003). A probabilidade de uma mulher ser infectada por HPV durante a sua vida é de 80-90%. Destas, 90% das infecções permanece indetetável nos primeiros 2 anos e em 5-10% das mulheres infectadas, a infecção pode persistir e progredir para carcinoma invasor (Sankaranarayanan *et al.*, 2015). A transmissão de HPV ocorre principalmente por contato pele-com-pele no entanto a atividade sexual tem uma grande influencia no risco de contração de infecção por HPV. O início de uma vida sexual precoce, múltiplos parceiros sexuais, idade precoce da primeira gravidez, multiparidade, uso prolongado de contraceptivos orais e má higiene são os principais fatores de risco para infecção por HPV em mulheres (Bouvard *et al.*, 2009; Chelimo *et al.*, 2013). Fumar, e mesmo a predisposição genética podem ser fatores de risco na progressão da doença (Castellsagué *et al.*, 2003).

De acordo com a sua associação a lesões precursoras de cancro, os HPVs podem ser agrupados em baixo risco ou alto risco. Os de baixo risco incluemos HPVs 6,11,42,43 e 44 sendo estes ligados principalmente a verrugas genitais benignas. HPVs de alto risco são considerados o agente etiológico de cancro do colo-do-útero. Estudos epidemiológicos indicam os tipos de HPV de alto risco associados a cancro do colo-do-útero, nomeadamente o HPV 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 70 (Burd E.M., 2003).

Os HPV 16 e HPV 18 são os HPVs de alto risco considerados mais carcinogênicos, sendo estes responsáveis por 50% e 20% dos casos de cancro do colo-do-útero, respetivamente (Smith *et al.*, 2007). A infeção por HPV pode levar a diferentes resultados, dependendo do tipo de HPV contraído. As verrugas anogenitais, tanto nas mulheres como nos homens, encontram-se normalmente associados a HPV6 ou HPV11 e não progridem para neoplasia, sendo a maioria assintomática e tratável. Quando uma infeção é latente ou inativa causa poucos ou nenhum sintoma e as áreas afetadas parecem histologicamente normais. O DNA viral pode ser encontrado em pelo menos 10% das mulheres com citologia cervical normal. Uma infeção ativa, associada a HPVs de alto risco, em que o vírus causa alterações nas células infetadas, pode resultar em neoplasia (Burd, 2003).

Foi gerada uma árvore filogenética que agrupa os diferentes tipos de HPV em géneros: O género *alfa* inclui aproximadamente 30 tipos de HPVs que afetam a mucosa do trato genital juntamente com vários tipos de HPV cutâneos. O género *beta* inclui HPVs cutâneos que, juntamente com radiação UV provocam o desenvolvimento de cancro de pele não melanoma (NMSC). Os restantes géneros incluem HPV cutâneos normalmente ligados ao desenvolvimento de papilomas cutâneos e verrugas (De Villiers *et al.*, 2004).

2.1. Genoma

O genoma do HPV é constituído por aproximadamente 8 *open reading frames* (ORF), possuindo 6 genes que se expressam precocemente e 2 genes que se expressam tardiamente, denominados respetivamente de E (Early) e L (Late). A região E é formada pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 e a região L é formada pelos genes L1 e L2, que codificam as proteínas estruturais da cápside. Somando-se a isso, o genoma é dotado de uma região reguladora LCR (*Long Control Region*) ou URR (*Upstream Regulatory Region*), variando de 400 a 1000 pbs, localizadas entre as regiões L1 e E6 (Figura 1). Além da origem de replicação, o genoma viral codifica também proteínas reguladoras que estimulam a entrada em ciclo celular e proliferação (Fehrmann *et al.*, 2003; Burd, 2003; Zheng *et al.*, 2006). Apesar do número limitado de genes no genoma dos papilomavírus, o número de proteínas codificadas é muito maior devido à existência de múltiplos promotores e de padrões de *splicing* complexos (Zheng *et al.*, 2006).

Apesar de existir entre papilomavírus variações no tamanho e número de ORFs em cada região, os genes envolvidos na replicação e montagem do vírus

encontram-se bem conservados. A maior diversidade ocorre nos restantes genes responsáveis pela entrada em ciclo celular, evasão ao sistema imune das células hospedeiras e libertação do vírus (Doorbar *et al.*,2012).

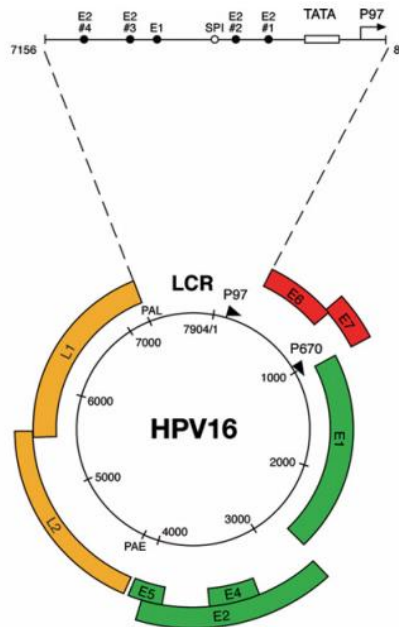


Figura 1- Ilustração representativa do genoma HPV (Doorbar,2006).

2.2. Proteínas virais

As proteínas virais E1 e E2 estão envolvidas na replicação do DNA viral e regulação da transcrição. A proteína viral E1 codifica uma DNA-*helicase* específica do vírus, necessária para a replicação do genoma viral e amplificação enquanto a proteína viral E2 tem a capacidade de controlar a expressão das proteínas virais E6 e E7 (Doorbar, 2006).

A proteína viral E5, que existe apenas em *papilomavírus* do género alfa, *downstream* do E2, encontra-se envolvida na evasão ao sistema imune e interage com várias proteínas transmembranares. As proteínas E6 e E7, reguladas pela proteína E2, apresentam funções essenciais para entrada em ciclo celular, replicação do DNA viral, inibição da imunidade inata e repressão da apoptose. Estas proteínas virais contribuem para a transformação maligna para cancro do colo-do-útero ao inativarem, as proteínas supressoras de tumores p53 e pRB, respetivamente. Enquanto as proteínas virais E5, E6 e E7 estão diretamente envolvidas no processo de transformação e repressão da resposta imune, os

restantes genes codificam proteínas que modificam o ambiente celular ou atuam sobre outra forma (Doorbar *et al.*,2015).

Os genes virais L1 e L2 são responsáveis pela síntese de proteínas estruturais da cápside (Doorbar *et al.*,2015). Além da formação da cápside, as proteínas virais L1 e L2 tem outras funções. A proteína L1, atua na interação entre o vírus e a célula hospedeira e a proteína L2 é responsável pela organização do genoma viral (Day *et al.*,1998; Buck *et al.*,2013).

2.3. Ciclo de vida do HPV

O ciclo de vida dos Papilomavírus depende da diferenciação celular do epitélio estratificado e o resultado da infecção depende da camada celular onde ocorre. A infecção inicial por HPV ocorre nas camadas mais baixas do epitélio estratificado, onde as células são menos diferenciadas (Stubenrauch *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1999; Pett *et al.*, 2007). Após a entrada do HPV na célula, o genoma viral estabiliza na forma de elementos extra-cromossômicos no núcleo e o número de cópias virais aumenta para aproximadamente 50 por célula. A infecção por HPV provoca a sobre expressão de E6 e E7 nas células basais do epitélio proliferativo. A instabilidade genética provocada pela infecção por HPV permite a acumulação de alterações genéticas e epigenéticas no genoma da célula hospedeira, ajudando à progressão de um fenótipo maligno (Hebner *et al.*, 1993). Ao sofrerem divisão, essas células infetadas distribuem o DNA viral equitativamente entre as células filhas. Uma das células filhas migra da camada basal e inicia o processo de diferenciação e maturação celular. As restantes células filhas continuam a dividir-se na camada basal e servem de reservatório de DNA viral para as posteriores divisões celulares (zur Hausen *et al.*, 2000; Doorbar *et al.*, 2005). Sendo a produção do HPV restrita às células suprabasais, as células na camada basal não são lisadas pela produção de novos vírus, continuando a proliferação. Para finalizar a síntese viral, o genoma viral codifica as duas proteínas da cápside L1 e L2, que são expressas na camada suprabasal mais diferenciada. Assim, são formadas partículas virais que são libertadas apenas quando as células infetadas alcançam a superfície do epitélio (Ozbun *et al.*, 1997).

3. Cancro do Colo-do-Útero

O cancro de colo-do-útero apresenta um importante impacto na vida de mulheres em todo mundo, maioritariamente em mulheres jovens, entre os 30 e 40 anos (Juckett e Hartman-Adams, 2010). A incidência deste cancro varia entre países desenvolvidos e países em desenvolvimento, sendo muito mais frequente em países em desenvolvimento onde ocorrem cerca de 80% dos novos casos (Parkin e Bray, 2006). O cancro colo-do-útero é o mais comum dos cancros do sistema reprodutor feminino e representa cerca de 4% de todos os cancros diagnosticados (<http://www.cdc.gov/cancer/international/statistics.htm>).

A incidência de cancro do colo-do-útero tem vindo a alterar-se em países desenvolvidos ao longo dos últimos 100 anos, verificando-se a partir dos anos 50 um aumento devido à evolução das técnicas de diagnóstico. A melhoria na prevenção e nas abordagens clínicas, tal como implementação de programas de rastreio ginecológico, levou à diminuição da taxa de incidência e de mortalidade do cancro do colo-do-útero (Saslow *et al.*, 2007).

A infeção persistente por HPV é a principal causa de cancro no colo-do-útero, sendo que o cancro do colo-do-útero é uma consequência rara de uma infeção persistente com um dos HPVs de alto risco (Bosch *et al.*, 2002). Após a infeção, acredita-se que o vírus mantenha o seu genoma com um número baixo de cópias sob a forma episossomal, havendo um nível baixo de expressão dos genes E6, E7, E1 e E2 mas suficiente para a manutenção do vírus (Doorbar, 2005).

A infeção por HPV de alto risco pode não ser o suficiente para desenvolver cancro do colo-do-útero, dependendo de uma variedade de fatores adicionais que atuam em conjunto com o vírus e patologias que diminuem a capacidade imunológica das células aumentam o risco de haver progressão do vírus (Muñoz, e Bosch, 1997).

Os HPV16 e HPV18 estão associados a 70-75% dos casos de cancro do colo-do-útero em todo mundo (Schiffman *et al.*, 2007). O conhecimento que a infeção por HPV seja o principal fator responsável por este tipo de cancro incentivou à criação de estratégias de controlo de doença, prevenção e deteção precoce, com intuito de erradicar o cancro do colo-do-útero.

3.1 História natural do cancro do colo-do-útero

O desenvolvimento de uma neoplasia no colo-do-útero envolve 4 fases distintas: transmissão de HPV, infecção por HPV persistente, progressão clonal de célula infetadas por HPV persistente para lesões precursoras e carcinoma invasor. O inverso também é possível, ou seja, ocorrer a eliminação natural da infecção por HPV e, menos frequentemente, ocorrer a regressão de uma lesão precursora para epitélio normal (Schiffman *et al*, 2007).

O processo desde a infecção por HPV até carcinoma invasor demora cerca de 20-30 anos. Essas infecções atingem um pico em mulheres com idades perto dos 25 anos e diminuem até atingir uma fase plateau entre os 30 e 35 anos. Em alguns países em desenvolvimento ocorre um segundo pico em mulheres com idades compreendidas entre os 45 e 50 anos. Assim, como a taxa de incidência tem tendência a diminuir com a idade, infecções adquiridas em idade jovem constituem a maioria dos casos de cancro do colo-do-útero (Stanley, 2006).

Alterações morfológicas pré-malignas caracterizadas como hiperplasia, displasia e carcinoma *in situ* podem ser observadas antes do aparecimento do quadro clínico do cancro do colo-do-útero. A maioria das displasias regride espontaneamente e apenas uma percentagem pequena das infecções por HPV de alto risco irão tornar-se persistentes e eventualmente, se não detetadas e tratadas, poderão evoluir para lesões precursoras de alto grau e posteriormente carcinoma invasor (Holowaty, *et al.*, 1999). O cancro do colo-do-útero não é associado a sintomas imediatos e muitas vezes, quando é detetado, já é demasiado tarde para que possa ser realizada uma intervenção curativa.

4. MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes constituídos por 19 a 25 nucleótidos, capazes de regular a expressão de genes ao nível pós-transcricional através da repressão da tradução ou degradação de moléculas-alvo de RNA mensageiro (mRNA) (Garofalo *et al.*, 2011). Os miRNAs *lin-4* e *let-7* foram os primeiros a serem descritos como componentes de uma rede reguladora de genes envolvidos no desenvolvimento larval em *C. elegans* (Lee *et al.*, 1993).

Os miRNAs têm vindo a receber cada vez mais atenção não só devido ao papel que desempenham em funções biológicas como o desenvolvimento, diferenciação e apoptose, mas também na resposta imunitária ao nível de mecanismos de tolerância e de auto-imunidade (Ambros, 2004; Bartel *et al.*, 2004; Pasquinelli *et al.*, 2005; O'Connell *et al.*, 2010; Simpson *et al.*, 2015).

Os miRNAs celulares são transcritos pela RNA polimerase II em transcritos primários (pri-miRNAs) longos caracterizados por uma estrutura em *hairpin* de ~80nts (Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). Os miRNAs maduros resultam do processamento dos pri-miRNAs que consiste em duas clivagens sequenciais mediadas por duas enzimas, Drosha e Dicer. A enzima Drosha, juntamente com a proteína DGCR8 (*DiGeorge syndrome chromosomal region 8*) clivam o transcrito dando origem ao pré-miRNA que é transferido do núcleo para o citoplasma pela exportina-5 (Yi *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004). No citoplasma, a enzima Dicer juntamente com a proteína TRBP (TAR RNA-binding protein) clivam o pré-miRNA, resultando em duas cadeias de miRNA (Chendrimada *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2012).

As duas cadeias de miRNA, miRNA-5p e miRNA-3p são desenroladas e enquanto uma das cadeias sofre maturação pelo complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) a outra é normalmente degradada (figura2) (Khvorova *et al.*, 2003; Gregory *et al.*, 2005).

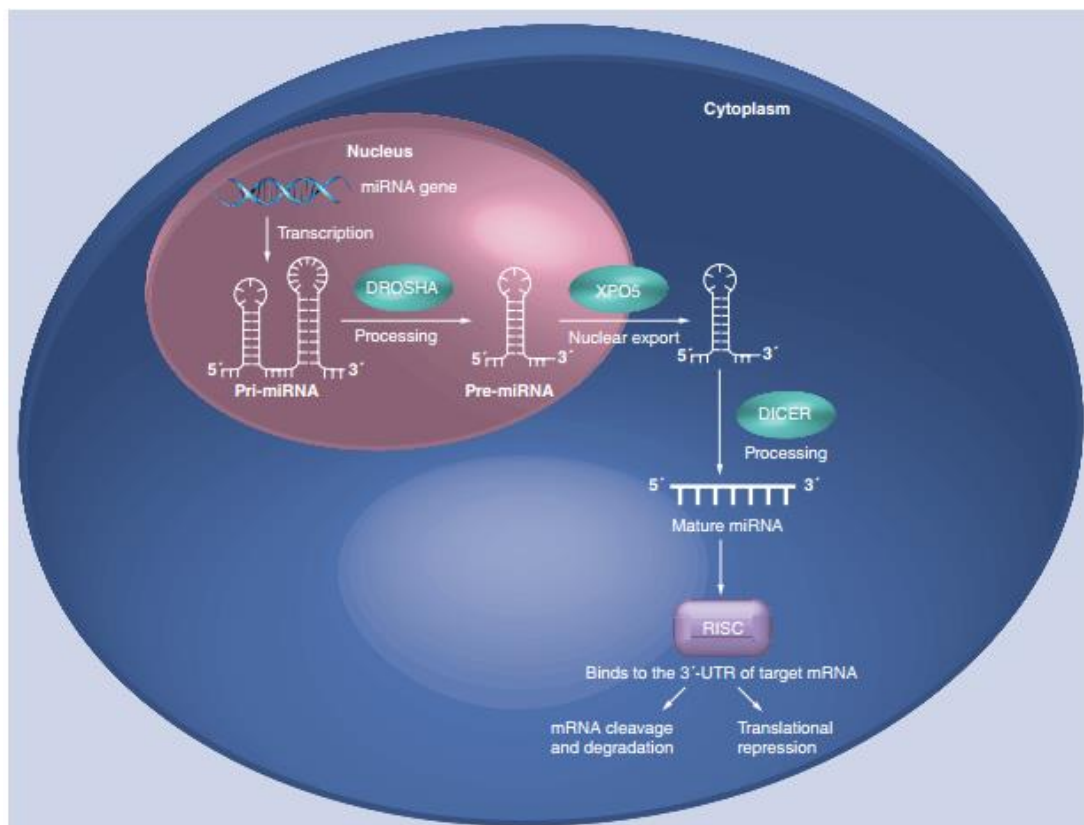


Figura 2 - Ilustração da biogénese de miRNAs (Dias *et al.*, 2013).

4.1 MiRNAs e Cancro

Os miRNAs, tal como outras moléculas, podem regular mecanismos importantes para a carcinogénese (He *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005; Meltzer, 2005). Um número crescente de estudos demonstram que os miRNAs desempenham um papel importante na iniciação, promoção, invasão e metastização em diferentes tipos de neoplasias (Sassen *et al.*, 2008; Galasso *et al.*, 2012; Iorio *et al.*, 2012). Os miRNAs foram implicados pela primeira vez no processo de carcinogénese em 2002, quando as sequências que codificam o miR-15 e o miR-16 foram identificadas numa região crítica do cromossoma 13q/14, que se encontra deletada na maioria dos casos de leucemia linfocítica crónica (Calin *et al.*, 2002). Desde então que a expressão alterada de miRNAs passou a ser estudada originando associações de expressão com diversas neoplasias como leucemia linfocítica crónica, cancro da mama e cancro do pulmão (Calin *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2010; van Schooneveld *et al.*, 2015).

A análise da expressão de miRNAs tem sido um ponto focal da biologia molecular no processo de compreender a carcinogénese e cada vez mais se verifica a importância dos miRNAs na carcinogénese humana. Estudos recentes sugerem que o papel regulador dos microRNAs não se limita apenas às células tumorais mas também ao microambiente tumoral. Por exemplo, as células tumorais podem escapar à ação das células B e T através da libertação de miRNAs imunossupressores ou por diminuição dos níveis de miRNAs importantes para ação do sistema imune (Ma *et al.*, 2012; Soon *et al.*, 2013).

Os miRNAs podem atuar como supressores tumorais em algumas neoplasias e como oncogenes noutras e, eventualmente, com funções opostas (ativação de um gene e desativação de outro) na mesma patologia dependendo das funções dos seus alvos (Garofalo *et al.*, 2011). Como os miRNAs participam na manutenção das vias reguladoras que determinam o destino das células, a sua desregulação contribui para a oncogénese e progressão tumoral (Calin e Croce, 2006).

4.2. Os miRNAs e HPV

Em infeções por HPV de alto risco, a regulação de miRNAs oncogénicos e supressores tumorais encontra-se alterada. Estas alterações podem ocorrer devido à ação de proteínas virais, principalmente E6 e E7 ou devido ao ganho do cromossoma 5p provocando aumento da expressão da enzima Drosha (Wang *et al.*, 2008; Muralidhar *et al.*, 2011)

Os miRNAs poderão estar envolvidos na regulação da replicação viral e progressão tumoral (Wang *et al.*, 2008). Vários estudos têm demonstrado diferenças nos perfis de expressão de miRNAs em carcinomas de células escamosas HPV positivas e linhas celulares HPV positivas comparadas com tecido controlo (Martinez *et al.*, 2008; Melar-New *et al.*, 2010).

4.3 MiR-146a

O miR-146a executa um papel importante no controlo da resposta imunológica evitando a inflamação excessiva, tendo sido identificado como fundamental para a regulação da imunidade inata. Um estudo realizado em leucemia monocítica aguda demonstrou que o miR-146a possui um papel fundamental na sinalização induzida por recetores TLR (Toll-like receptor). Foi observado um aumento de expressão do miR-146a em resposta apenas a TLRs da superfície celular, sugerindo que este miRNA possa estar relacionado com a diminuição da resposta inflamatória a agentes patogéneos extracelulares (Taganov *et al.*, 2006). Encontra-se bem documentado que o miR-146a apresenta um papel importante em vários cancros e em doenças auto-imunes e anti-inflamatórias (Baltimore *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2011). O miR-146a é altamente expresso quando ocorre a ativação de cascatas de sinalização induzida pelos recetores TLR ou citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 β . Entre os alvos de regulação do miR-146a encontram-se elementos importantes para as vias de sinalização ativadas por recetores TLR como IRAK1 e TRAF6 (Rusca e Monticelli, 2011).

O IRAK1 (*Interleukin-1 receptor associated kinase*) é um importante mediador das sinalizações ativadas por TLR e IL1R (Interleukin-1 receptor) (Rhyasen e Starczynowski, 2015).

A proteína TRAF6, um membro da família TRAF (*TNF receptor associated factor*) é inibida pelo miR-146a, que se liga à região 3'UTR do seu mRNA. A proteína TRAF6 atua como uma ubiquitina ligase (E3) que ativa a cinase I κ B (inibidor de kappa B), levando à degradação da I κ B e à translocação nuclear e ativação do fator de transcrição NF- κ B (Konno *et al.*, 2009; Nahid *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009).

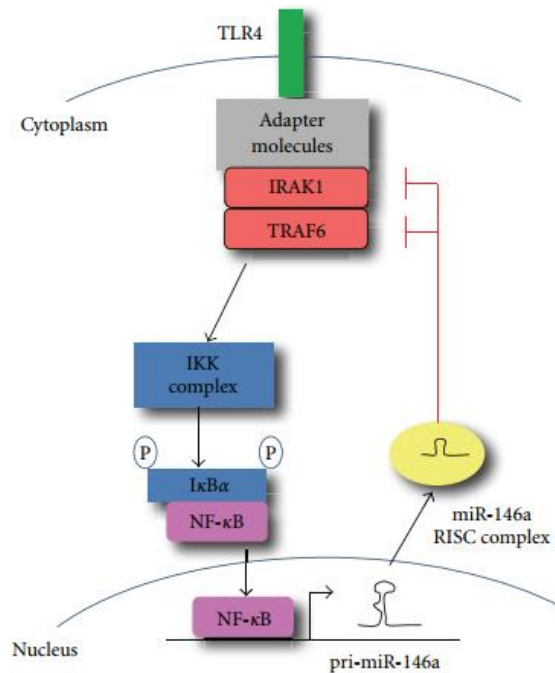


Figura 3 - Ilustração do *loop* de *feedback* negativo onde participa o miR-146a (Rusca e Monticelli, 2011).

Um dos eventos chave na carcinogênese é a inflamação, que conduz à ativação do fator de transcrição NF-κB. Estudos reportaram a existência de um mecanismo de regulação da via TRAF6/NF-κB, durante a inflamação ou provocado por uma resposta a infecção viral. Este mecanismo atuaria por feedback negativo atuando de forma a evitar uma reação inflamatória excessiva (Taganov *et al.*, 2006; Rusca e Monticelli, 2011). A estimulação da TRAF6 leva ao aumento da atividade de NF-κB, que regula positivamente a expressão de miR-146a. O aumento da expressão do miR-146a por sua vez, suprime a atividade TRAF6 e NF-κB que termina a resposta imune, originando um *loop* de *feedback* negativo. O miR-146a é, portanto, um componente chave na regulação da atividade do NF-κB, ao direcionar componentes de várias vias de ativação (Rusca e Monticelli, 2011).

5. Murganhos K14-HPV16

Vários modelos de murganhos transgênicos foram desenvolvidos para a investigação da tumorigênese induzida por HPV (Arbeit *et al.*, 1994; Herber *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1999). Um dos modelos de murganhos transgênicos atualmente disponível para o estudo de neoplasias associadas a infecção por HPV16 é o modelo transgênico K14-HPV16 (Arbeit *et al.*, 1994). Estes murganhos transgênicos transportam sequências de HPV16 a partir de nucleótidos (nt) 97-6152 e incluem as ORFs (*Open Reading Frames*) para as oncoproteínas E6, E7, E1, E2, E4, e E5 da região *early* do genoma do HPV16 (Coussens *et al.*, 1996). Estando sobre o controlo do promotor da queratina-14 (K14), a expressão dos genes do HPV16 é direcionada para as células basais dos epitélios queratinizados. Quando expostos a estrogénio, estes animais desenvolvem patologias cervicais (Arbeit *et al.*, 1994). O fenótipo surge às 5 semanas de idade como hiperplasia, papilomatose epitelial, displasia e metaplasia. Apenas uma pequena fração destes animais desenvolve tumores invasivos microscópicos (Elson *et al.*, 2000). Células obtidas de tumores do colo-do-útero destes animais exibem padrões de expressão de biomarcadores semelhante ao dos humanos (Brake *et al.*, 2003).

Outro modelo, utilizando o mesmo promotor K14 para direcionar a expressão do oncogene HPV16-E7 resultou no desenvolvimento de displasia cervical de alto grau e outras malignidades cervicais invasivas em 80% dos animais (Riley *et al.*, 2003).

Na estirpe FVB/n, desenvolvem-se espontaneamente carcinomas de células escamosas (SCCs) em 21% dos animais entre os 8 e 12 meses de idade. Os carcinomas, resultantes de lesões pré-malignas, possuem graus distintos de diferenciação de acordo com o grau de malignidade (Coussens *et al.*, 1996). Na pele destes animais desenvolvem-se focos de displasia entre os 3 e os 6 meses de idade que progridem para carcinoma invasivo em metade dos animais até um ano de idade. Esta progressão é acompanhada pelo aumento de expressão de fatores pró-angiogénicos como VEGF e bFGF (Arbeit *et al.*, 1996; Smith-McCune *et al.*, 1997).

Enquanto a estirpe FVB/n apresenta suscetibilidade à conversão maligna, outras estirpes demonstram maior resistência. Por exemplo, a estirpe C57BL/6 apenas desenvolve hiperplasias, enquanto que as estirpes BALB/c e SSIN/SENCAR

desenvolvem apenas displasias e papilomas (Leder *et al.*, 1990; Lambert *et al.*, 1993).

A capacidade para investigar os perfis de expressão de genes do HPV em diferentes fases pré-neoplásicas e progressão do cancro é geralmente limitada pela heterogeneidade celular das lesões.

Este trabalho vem com o principal objetivo de caracterizar a expressão do miR-146a durante o processo de carcinogénese por HPV, dando seguimento aos estudos e trabalhos desenvolvidos anteriormente no atual grupo de pesquisa, usando murganhos K14-HPV16 (Paiva *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2015).

Capítulo II - OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar o perfil de expressão do miR-146a em amostras de pele de murganhos transgênicos K14-HPV16.

Objetivos específicos

Estudar o efeito do HPV16 sobre a expressão do miR-146a

Avaliar a expressão do miR-146a em murganhos transgênicos K14-HPV16 com diferentes lesões pré-neoplásicas.

Estudar o efeito do celecoxib e do dimetilaminopartenolídeo sobre a expressão do miR-146a em murganhos transgênicos K14-HPV16.

Capítulo III - MATERIAIS E MÉTODOS

1. Murganhos transgénicos K14-HPV1

Para este estudo foram utilizados murganhos do sexo feminino transgénicos hemizigóticos K14-HPV16 (HPV16^{+/}) e *wild-type* (HPV16^{-/-}), pertencentes à estirpe FVB/n. Estes murganhos foram generosamente oferecidos à Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto pelo Doutor Jeffrey Arbeit e pelo Doutor Douglas Hanahan da Universidade da Califórnia através do *USA National Cancer Institute Mouse Repository* e foram mantidos e reproduzidos no biotério da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. O desenvolvimento dos murganhos transgénicos K14-HPV16 foi previamente relatado (Arbeit *et al.*, 1994). O trabalho foi parcialmente desenvolvido no âmbito de uma tese de mestrado anterior e de uma tese de doutoramento em curso (Santos *et al.*, 2015).

Os animais foram mantidos e reproduzidos de acordo com a legislação Portuguesa (Portaria 1005/92 de 23 de outubro) e europeia (Directiva da UE / 63 / UE 2010), sob condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C), ciclo luz-escuridão (12h luz / 12h escuridão) e humidade relativa ($50 \pm 10\%$). Os animais receberam uma dieta padrão na forma de “*pellets*” (4RF21 GLP, Mucedola, Itália) e água *ad libitum*. A avaliação das condições de saúde de cada animal foi realizada diariamente.

2. Desenho Experimental

Para a realização deste trabalho, foram utilizadas amostras obtidas durante protocolos experimentais inseridos no âmbito de outros estudos, como referido nos parágrafos anteriores. De acordo com esses protocolos experimentais 106 murganhos foram divididos em 8 grupos experimentais de acordo com a Tabela 2. Os fármacos foram administrados oralmente, como anteriormente descrito (Santos *et al.*, 2015).

Tabela 2 - Associação entre a idade, genótipo e tratamento em cada grupo de murganhos em estudo.

Grupo	Idade	Genótipo	Tratamento (dose por dia)	Tecido
1 (n=27)	24-26 semanas	(HPV16 ^{-/-})	Sem tratamento	Peito
2 (n=30)	24-26 semanas	(HPV16 ^{+/-})	Sem tratamento	Peito
3 (n=9)	24-26 semanas	(HPV16 ^{+/-})	Celecoxib 75mg/kg	Peito
4 (n=11)	24-26 semanas	(HPV16 ^{+/-})	DMAPT 100mg/Kg	Peito
5 (n=7)	28-30 semanas	(HPV16 ^{-/-})	Sem tratamento	Peito
6 (n=7)	28- 30 semanas	(HPV16 ^{+/-})	Sem tratamento	Peito
7 (n=6)	24-26 semanas	(HPV16 ^{-/-})	Sem tratamento	Orelha
8 (n=9)	24-26 semanas	(HPV16 ^{+/-})	Sem tratamento	Orelha

3. Colheita das amostras

Os animais foram humanamente sacrificados por *overdose* de pentobarbital de sódio por via intraperitoneal, seguido de punção intracardíaca e exsanguinação, tal como indicado pela *Federation for Laboratory Animal Science Association* (FELASA). As amostras de pele de peito e de orelha de murganhos foram recolhidas em diferentes semanas de idade (24-26 semanas e 28-30 semanas) e posteriormente maceradas e mantidas em *TriPure* (Roche® Applied Science) a -80°C até ao seu processamento. As amostras para análise histológica (aproximadamente 1cm²) foram colhidas em formaldeído tamponado a 10%.

4. Genotipagem: HPV16 -E6 E HPV16-E2

Para a genotipagem foram utilizados fragmentos das caudas dos murganhos. A extração de ácidos nucleicos foi realizada depois de determinada a pureza do DNA. A presença de DNA de HPV integrado foi avaliado pela amplificação dos

genes HPV-E2 e HPV-E6 usando a metodologia de PCR previamente descrita (Paiva *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2015).

5. Análise Histológica

Secções histológicas (2 µm de espessura) foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para análise em microscópio ótico. As amostras foram classificadas como pele normal, hiperplasia epidérmica, displasia epidérmica e carcinoma *in situ* (CIS).

6. Análise da expressão do miR-146a

A extração específica de miRNAs foi realizada utilizando o kit TripleXtractor da GRISP de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do RNA foi avaliada utilizando o NanoDrop® spectrophotometer v3.7 (Thermo Scientific, Wilmington DE, EUA).

A expressão do hsa-miR146a-5p-000468 foi analisada utilizando os protocolos two-step real-time PCR com recurso ao TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems®, Foster CA, USA). A conversão de miRNA em cDNA (DNA complementar) foi realizada utilizando TaqMan®MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®, Foster CA, EUA) em 10µL de volume total de mistura de reação .

6.1 PCR em tempo real

Nesta etapa foi utilizada a técnica para análise de expressão baseada em amplificação por *qRT-PCR* (PCR quantitativo em tempo real) utilizando *primers* específicos e todas as análises por qRT-PCR foram realizadas em duplicado. Recorremos à técnica de PCR quantitativo em tempo real para quantificação dado ser uma técnica extremamente sensível, com boa reprodutibilidade e grande capacidade de quantificação que possibilita a monitorização em tempo real da quantificação de DNA e RNA.

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) foi realizada no StepOne Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster CA, EUA) a partir de 10 µL de volume

final. Todas as reações foram realizadas em duplicado e incluíram também dois controlos negativos.

Foi utilizada esta técnica para determinar níveis de expressão do miR146a com o objetivo de comparar as expressões entre amostras de murganhos de grupos controlo (HPV^{-/-}) e transgénicos (HPV^{+/-}).

6.2 Quantificação e Análise Estatística

Para quantificar os resultados obtidos por qPCR foi utilizado o método de comparação dos C_T (ou método ΔC_T).

O método ΔC_T requer uma correção para as variações experimentais, obtida pela normalização dos resultados. A cada valor C_T médio do controlo endógeno foi subtraído o valor de C_T médio do miR em estudo. A fórmula utilizada encontra-se apresentada a seguir:

$$\text{Quantificação relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_T}, \text{ onde } \Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ controlo endógeno} - \Delta C_T \text{ miR-146a}$$

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software IBM®SPSS®Statistics para Windows (versão 22.0). Juntamente com o método de comparação dos C_T, foi utilizado o teste t de *Student*, para avaliar as diferenças na expressão normalizada do miR-146a. Para analisar a expressão normalizada relativa ($-\Delta C_T$) dos diferentes grupos, consideram-se os resultados representativos de 99% ($X \pm 2SD$) e o valor considerado estatisticamente significativo foi de $p \leq 0.05$.

Os resultados dos níveis de expressão relativa estão apresentados em forma de diagrama de extremos e quartis.

Capítulo IV: RESULTADOS

1. Análise macroscópica

Os murganhos *wild-type* apresentavam o fenótipo normal da sua estirpe, sem qualquer lesão cutânea, enquanto os murganhos transgênicos, demonstravam vários tipos de lesões características, como alopecia cefálica, eritema auricular e hiperqueratose (seborreia) difusa (Figura 4).

a) Wild-type (HPV16-/-)



b) Transgênicos (HPV16+/-)



Figura 4 – Análise macroscópica de murganhos *wild-type* (hpv-/-) e transgênicos (hpv16 +/-). O animal transgênico apresenta hiperqueratose e eritema auricular (b).

2. Análise histológica

Através da avaliação histológica dos diferentes grupos de murganhos, conseguimos distinguir diferentes tipos de lesões pré-malignas (figura 6). Os dados encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 – Análise histológica dos grupos de murganhos.

Grupo	Idade (semanas)	Genótipo	Tratamento	Classificação histológica				
				Normal	Peito Hiperplasia	Displasia	Orelha Normal	CIS
1 (n=27)	24-26	(HPV16 ^{-/-})	-	27/27(100%)	0/27(0%)	0/27(0%)	-	-
2 (n=30)	24-26	(HPV16 ^{+/-})	-	0/30(0%)	30/30(100%)	6/30(20%)	-	-
3 (n=8)	24-26	(HPV16 ^{+/-})	Celecoxib	0/8(0%)	8/8(100%)	1/8(12,5%)	-	-
4 (n=11)	24-26	(HPV16 ^{+/-})	DMAPT	0/11(0%)	11/11 (100%)	2/11(18,2%)	-	-
5 (n=7)	28-30	(HPV16 ^{-/-})	-	7/7(100%)	0/7(0%)	0/7(0%)	-	-
6 (n=6)	28-30	(HPV16 ^{+/-})	-	0/6(0%)	3/6(50%)	6/6(100%)	-	-
7 (n=6)	24-26	(HPV16 ^{-/-})	-	-	-	-	6/6(100%)	0/6(0%)
8 (n=9)	24-26	(HPV16 ^{+/-})	-	-	-	-	0/9(0%)	9/9(100%)

n= número de amostras utilizadas para histologia.

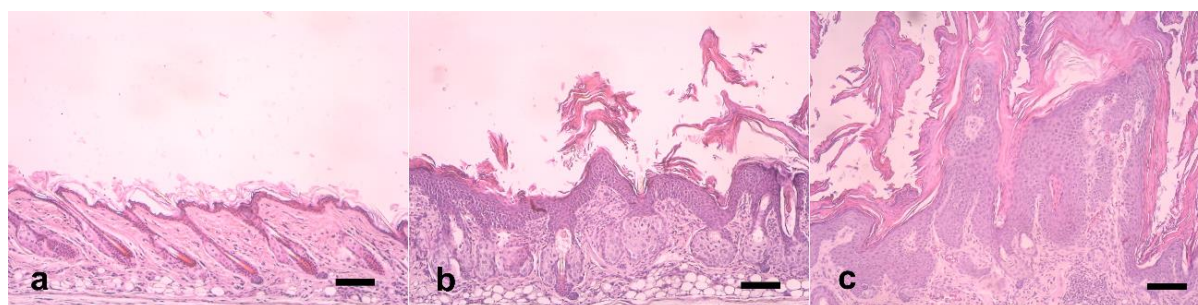


Figura 5- Análise histológica de murganhos wild-type e murganhos transgênicos. H&E, 100x
a) pele de murganho wild-type com histologia normal. b) pele de murganho transgênico K14-hpv16 apresentando hiperplasia epidérmica. c) pele de murganho transgênico K14-hpv16 apresentando displasia.

3. Análise da expressão do miR-146a

3.1 Murganhos transgênicos versus murganhos *wild-type*

Com o objetivo de analisar a influência do HPV16 na expressão do miR-146a, quantificou-se a sua expressão em amostras de murganhos *wild-type* (HPV16 $-/-$) e em amostras de murganhos transgênicos (HPV16 $+/-$). Observou-se que amostras de murganhos transgênicos apresentavam níveis de expressão mais altos quando comparado com murganhos *wild-type* ($p=0,011$) (Figura 6).

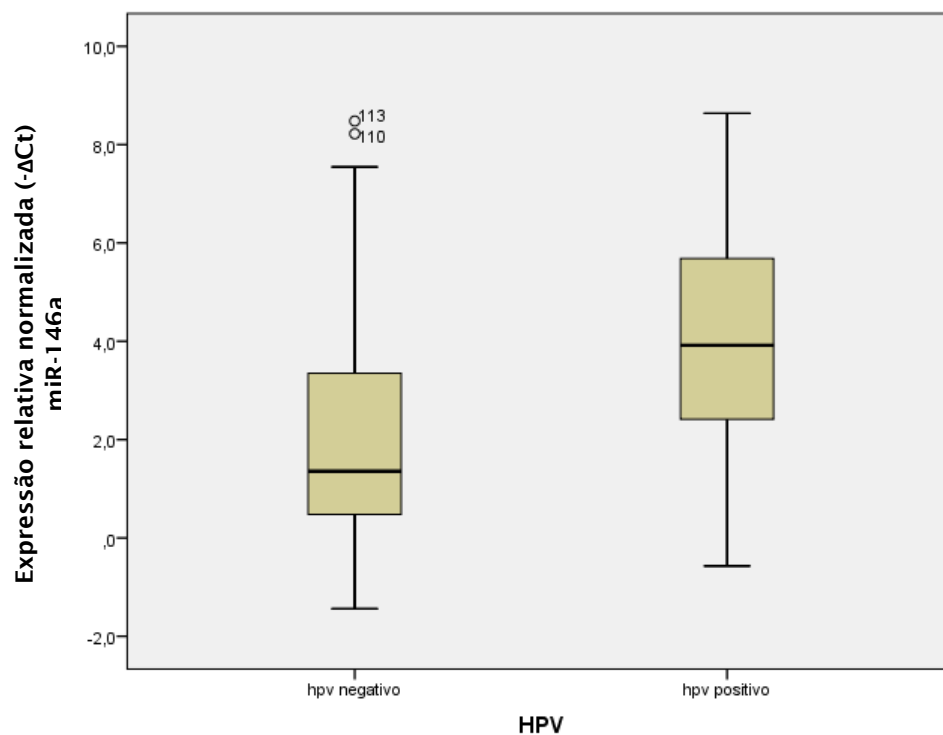


Figura 6- Expressão relativa normalizada do miR-146a em murganhos *wild-type* (HPV16 $-/-$), $n=40$) e em murganhos transgênicos (HPV16 $+/-$), $n=45$).

3.2 Expressão do miR-146a em diferentes lesões induzidas pelo HPV16

Para avaliar a expressão do miR-146a em diferentes fases da transformação neoplásica, foram utilizadas amostras dos grupos 2,6 e 8 (24-26 semanas, 28-30 semanas e pele de orelha) que apresentaram, histologicamente, maior percentagem de hiperplasia, displasia e carcinoma *in situ*, respetivamente.

Observou-se um aumento significativo na expressão do miR-146a em murganhos HPV^{+/+} de 28-30 semanas comparando com murganhos HPV^{+/+} de 24-26 semanas ($p=0,022$) (figura 7).

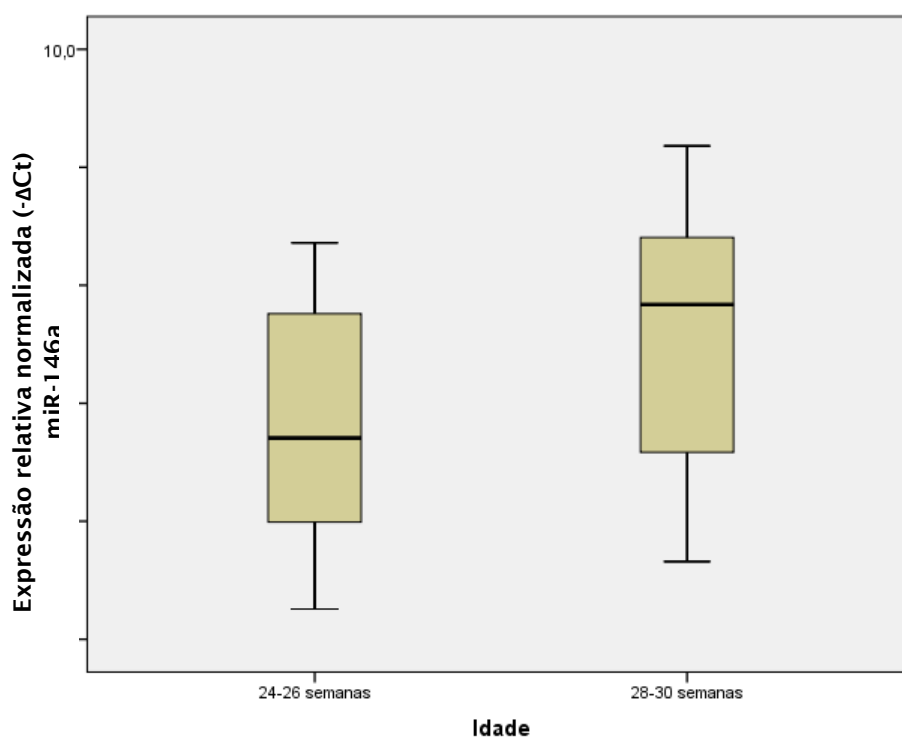


Figura 7– Expressão relativa normalizada do miR-146a em murganhos transgênicos (HPV16 ^{+/+}), de 24-26 semanas ($n=30$) e 28-30 semanas ($n=6$).

Ao comparar com amostras de pele de orelha de murganhos transgênicos observamos uma diminuição significativa na expressão do miR-146a em CIS comparando com displasia e hiperplasia ($p=0,005$) (figura 8).

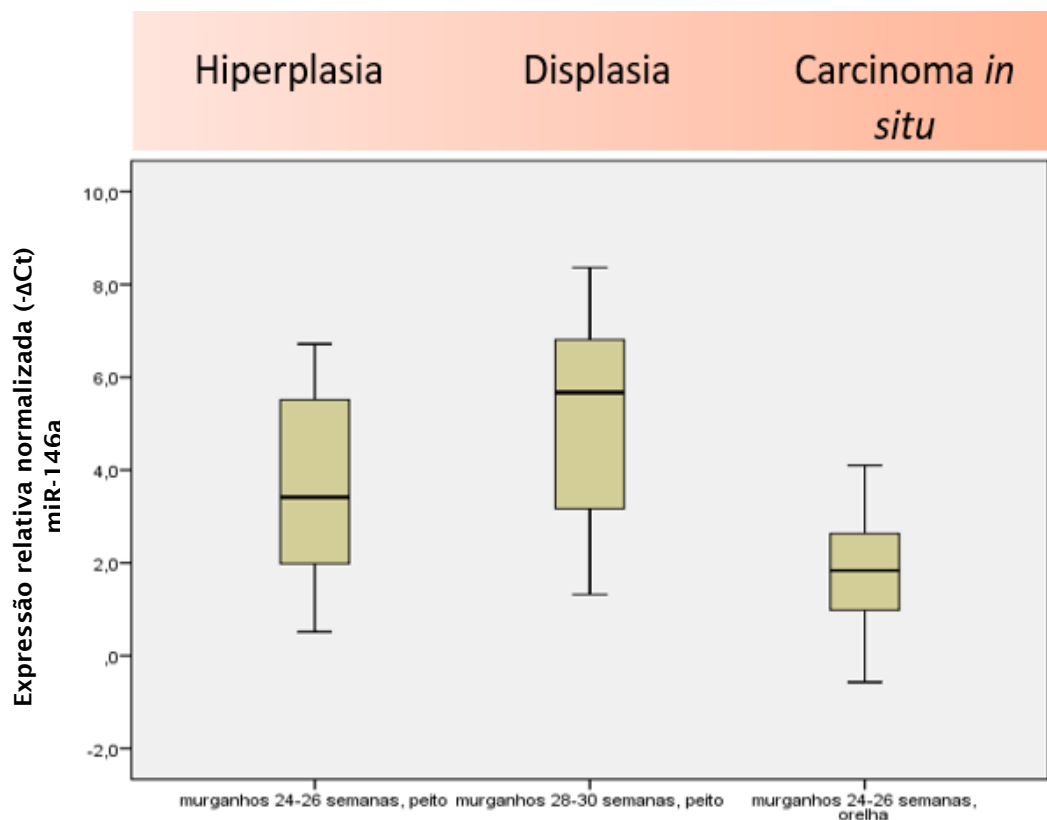


Figura 8 - Expressão relativa normalizada do miR-146a em murganhos transgênicos com diferentes lesões induzidas pelo HPV16, representadas por amostras de peito de murganhos transgênicos com 24-26 semanas ($n=30$), amostras de peito de murganhos transgênicos com 28-30 semanas ($n=6$) e amostras de orelha de murganhos transgênicos com 24-26 semanas ($n=9$).

Para ser possível a comparação da expressão do miR-146a em tipos de pele distintos, realizamos primeiro uma comparação da expressão do miR-146a em murganhos *wild-type* e verificamos que não existem diferenças significativas entre pele de peito e pele de orelha ($p=0,675$) (figura9).

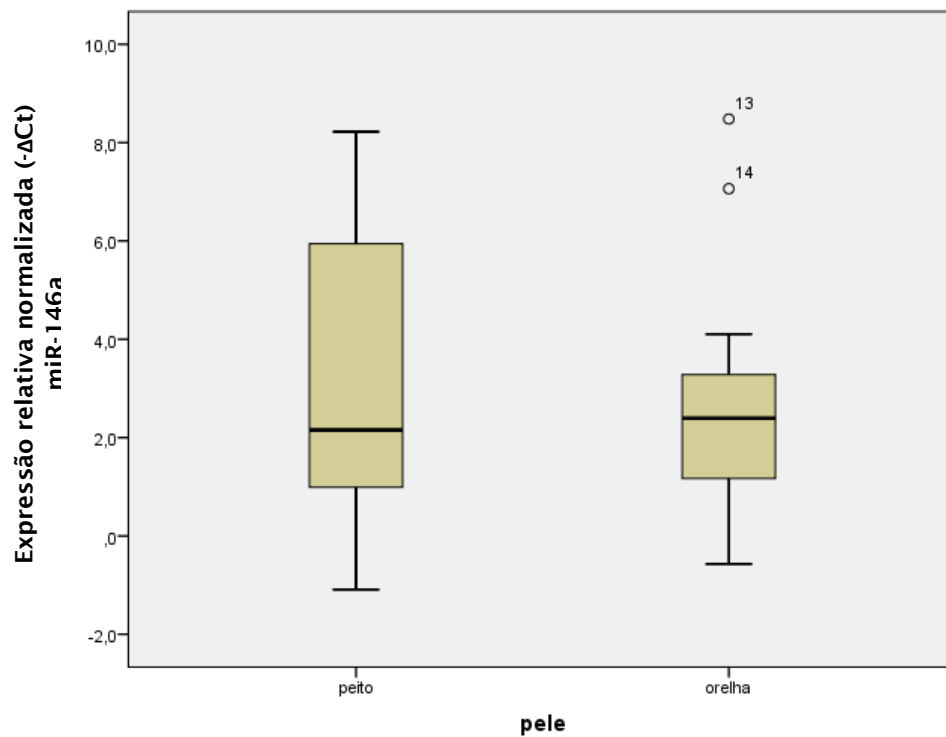


Figura 9 - Expressão relativa normalizada do miR-146a em amostras de pele de peito ($n=6$) e pele de orelha ($n=6$) de murganhos *wild-type*.

4. Análise do efeito de anti-inflamatórios na expressão do miR-146a

4.1 Celecoxib

No grupo de murganhos transgênicos ao qual foi administrado celecoxib (grupo 4) verificamos um aumento significativo na expressão de miR-146a em murganhos transgênicos que foram administrados com celecoxib comparado com murganhos transgênicos que não receberam tratamento (grupos 2 e 3) ($p=0,009$) (Figura 10).

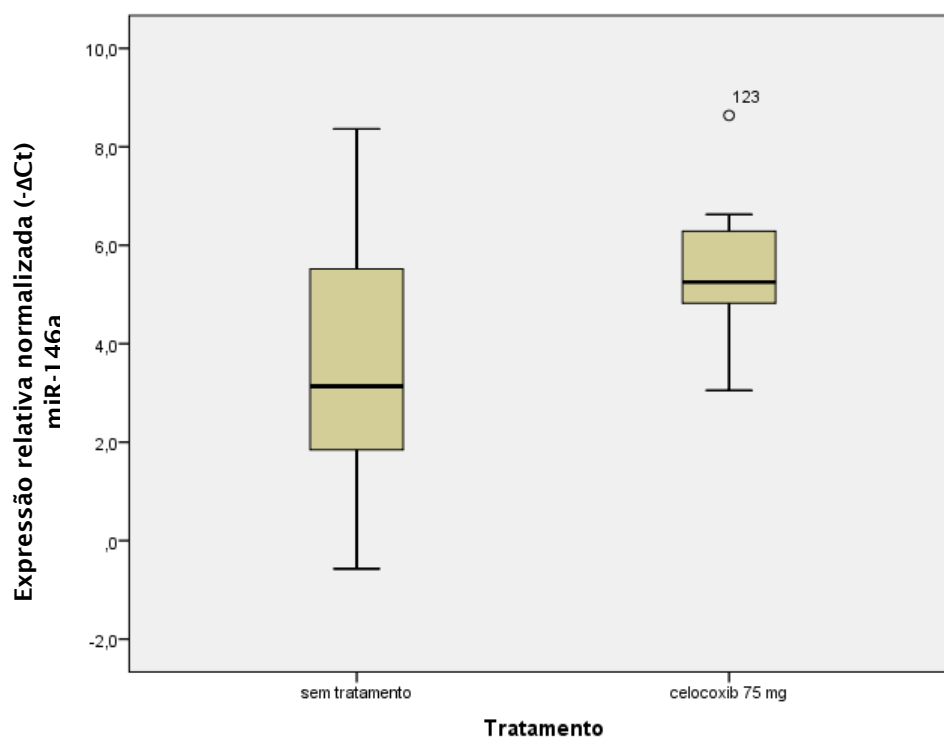


Figura 10- Expressão relativa normalizada do miR-146a em murganhos transgênicos de 24-26 semanas que não receberam tratamento ($n=30$) e em murganhos transgênicos de 24-26 semanas que receberam tratamento com celecoxib 75 mg/Kg/dia ($n=9$).

4.2 DMAPT

Foi realizado, em paralelo, um estudo de expressão de miR-146a em murganhos transgênicos aos quais foi administrado DMAPT, um inibidor do NF-KB.

Tendo em conta que o efeito anti-inflamatório causado pelo celecoxib advém do seu efeito sobre a COX-2 ou sobre NF-KB, foi realizada a avaliação de expressão do miR-146a em murganhos tratados com DMAPT, um anti-inflamatório de inibição direta sobre o NF-KB.

Neste caso foi observado um aumento significativo na expressão do miR-146a em murganhos HPV16relativamente a murganhos não tratados ($p=0,036$) (Figura 11).

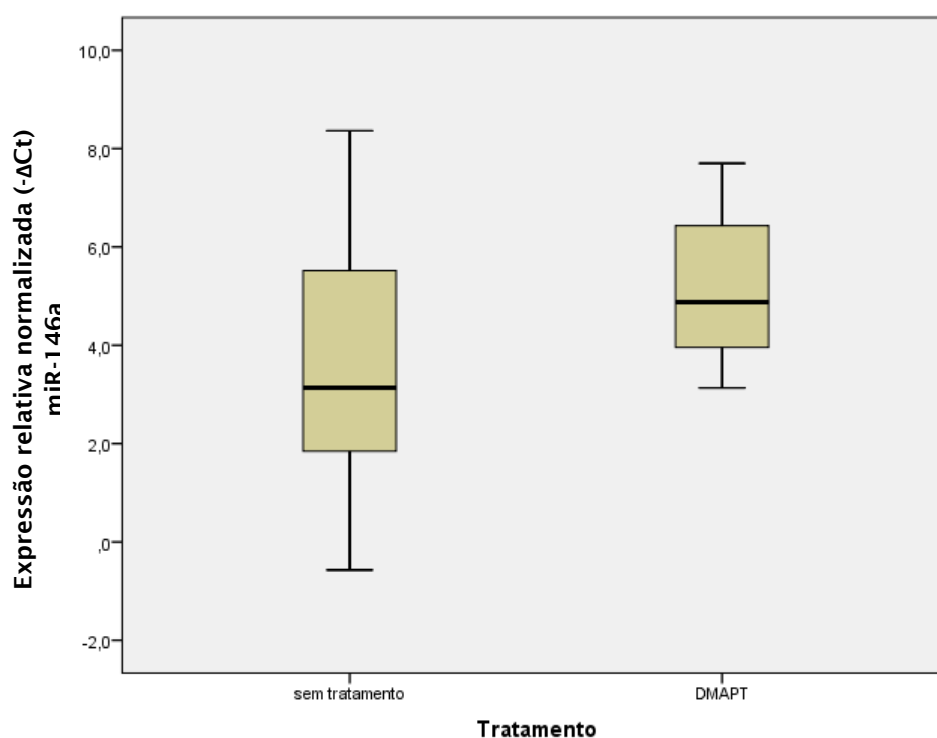


Figura 11- Expressão relativa normalizada do miR-146a em murganhos transgênicos de 24-26 semanas que não receberam tratamento ($n=30$) e em murganhos transgênicos que receberam tratamento com DMAPT 100 mg/Kg/dia ($n=11$).

Capítulo V - DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado no Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do IPO-Porto com a colaboração do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, do Departamento de Ciências Veterinárias da Universidade e Trás-os-Montes e Alto Douro e do Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Tecnologia e Ambiente da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Este trabalho foi proposto com o objetivo de comparar a expressão do miR-146a em amostras de murganhos *wild-type* e murganhos transgénicos K14-HPV16. Também foi proposto a investigação do papel deste microRNA no controlo de inflamação em murganhos K14-HPV16 tratados com anti-inflamatórios.

Novas abordagens terapêuticas e novas técnicas de diagnóstico poderão surgir da melhor compreensão da expressão e função de miRNAs, podendo permitir a identificação de lesões pré-neoplásicas e melhor follow-up de pacientes. As variações de expressão do miRNAs em doenças específicas torna-os um biomarcador valioso. O uso destes pequenos RNAs não codificantes como possíveis marcadores para desenvolvimento de cancro associado a HPV poderá ser uma nova abordagem a implementar no futuro (Wang *et al*, 2008).

O HPV é responsável por um número elevado de infeções, que na maioria das vezes são assintomáticas e de regressão espontânea. Estas infeções podem originar lesões benignas, mas em situações raras, podem evoluir para cancro.

Em cancro do colo-do-útero, nas neoplasias mais associadas à infeção por HPV, parece existir relação entre a infeção por HPV e a expressão do miR-146a.

Os murganhos transgénicos K14-HPV16 são modelos experimentais úteis para estudar a progressão de carcinogénese induzida por HPV, permitindo a distinção entre as várias etapas da progressão: hiperplasia, displasia e carcinoma *in situ*. Todos os murganhos transgénicos K14-HPV16 acabam por desenvolver lesões hiperplásicas e/ou displásicas observadas na epiderme do peito e tronco (Arbeit *et al.*, 1994). A estirpe FVB/n tem-se demonstrado particularmente predisposta ao desenvolvimento de neoplasias associadas ao HPV (Lambert *et al.*, 1993).

1. Análise de expressão do miR-146a

1.1 Murganhos transgênicos versus *wild-type*

Os resultados obtidos neste estudo indicam que os níveis de expressão de miR-146a são superiores em murganhos transgênicos (HPV^{+/+}) comparativamente com murganhos *wild-type* (HPV^{-/-}) ($p=0,011$). Com base nestes resultados, a expressão do miR-146a parece ser influenciada pela presença do genoma viral do HPV. Especificamente, estes resultados sugerem que a sobre-expressão do miR-146a poderá ter um impacto no desenvolvimento de lesões promovidas pelo HPV. Dados da literatura sugerem haver sobre-expressão deste microRNA em cancro do colo-do-útero. Vários estudos relataram aumento de expressão do miR-146a em cancro do colo-do-útero e ainda que a introdução deste microRNA em linhas celulares epiteliais cervicais provoca proliferação celular (Lee *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Gocze *et al.*, 2013). Aumento de miR-146a verifica-se também em carcinoma papilar da tiroide, carcinoma anaplásico da tiroide e verificou-se a correlação entre aumento da expressão do miR-146a com progressão metastática em tumores orais (He *et al.*, 2005; Pacifico *et al.*, 2010; Scapoli *et al.*, 2010). Sendo o miR-146a capaz de atuar como supressor tumoral ou como oncomir, o seu papel pode variar em diferentes tipos de cancro humanos. Estudos verificaram níveis baixos do miR-146a em cancro da próstata, cancro pancreático e cancro gástrico (Lin *et al.*, 2008; Li Y. *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2011; Kogo *et al.*, 2011).

Um estudo recente demonstrou que a proteína viral E5 atua sobre o miR-146a, provocando aumento de expressão (Greco *et al.*, 2011). O miR-146a, sendo também um importante promotor da proliferação celular, poderá ser crucial para a progressão tumoral induzida pela infeção por HPV.

A proteína viral E5 contribui para o desenvolvimento e progressão de cancro do colo-do-útero ao regular varias proteínas celulares, provocando alterações ao nível da sinalização celular, transcrição e alterações nos processos angiogénicos e apoptóticos. Além disso, encontra-se envolvida na evasão ao sistema imune e interage com várias proteínas transmembranares (Doorbar *et al.*, 2010).

Em outro contexto, células T reguladoras (Treg) são capazes de facilitar a evasão viral ao sistema imune. Estas células apresentam um fenótipo CD4⁺CD25⁺FoxP3 e apresentam um papel importante na prevenção de agressões

pelo sistema imune. Por apresentarem função imunossupressora, células Treg são muitas vezes associadas a infecção persistente e progressão tumoral. Estas limitam os danos colaterais resultantes de imunidade contra infecções (Halvorsen *et al.*, 2014). Vários estudos constataam níveis elevados de expressão de miR-146a em células Treg e um papel fundamental deste microRNA na tolerância imunológica mediada por células Treg. O miR-146a poderá assim, participar desta forma no controlo da resposta imune, permitindo ao HPV escapar à imunovigilância.

O aumento do miR-146a sugere um papel como oncomir e uma vez que este microRNA se encontra envolvido em vias de inflamação, resposta imune e também apoptose, o aumento da sua expressão sugere um aumento da inflamação em murganhos transgênicos. Com base nestes resultados, o HPV16 parece ter um impacto na expressão do miR-146a.

Estes resultados são importantes na determinação da utilidade da expressão do miR-146a na discriminação de tecidos com maior predisposição ao desenvolvimento de cancro.

1.2 Influência da progressão das lesões pré-neoplásicas

De acordo com a literatura, até ao fim do primeiro mês de idade, 100% dos murganhos K14-HPV16 desenvolve hiperplasia. Lesões hiperplásicas progridem focalmente para displasia entre os 3-6 meses de idade e aos 8-12 meses de idade 50% dos murganhos desenvolve um carcinoma epidermal de células escamosas. Destes, 30% metastizam para os gânglios linfáticos (Arbeit J.M. *et al.*, 1994; Coussens *et al.*, 1996).

Os resultados obtidos neste estudo revelam um aumento significativo ($p=0,022$) na expressão do miR-146a em murganhos transgênicos de 28-30 semanas (grupo 6) comparando com murganhos transgênicos de 24-26 semanas (grupo 2). Este resultado indica que a progressão neoplásica é acompanhada pelo aumento da expressão deste microRNA nas fases iniciais do desenvolvimento neoplásico.

Existe uma ligação entre inflamação e predisposição para desenvolvimento de cancro. A inflamação a longo termo leva ao desenvolvimento de displasia e em células infetadas por HPV de alto risco pode levar ao desenvolvimento de cancro do colo-do-útero (Rakoff-Nahoum, 2006).

A inflamação pode representar uma resposta imune contra o tumor ou pode, por outro lado, estimular o crescimento tumoral. Durante a carcinogénese a inflamação persiste para a obtenção de uma condição crónica. O estado inflamatório pode contribuir para o desenvolvimento tumoral através de diferentes mecanismos, como: indução de instabilidade genómica, alterações de agentes epigenéticos e consequentemente, a expressão inapropriada de genes e miRNAs (Mantovani *et al*, 2008).

O fator de transcrição NF-KB parece ser constitutivamente ativo em carcinoma in situ, por ação de HPV16. Em tecido normal e em lesões de baixo grau as subunidades do NF-KB localizam-se principalmente no citoplasma, ao contrário de lesões de alto grau e em carcinoma em que estas se encontram no núcleo e a expressão do inibidor IKB α se encontra diminuída (Nair *et al*, 2003). Vários estudos demonstraram a ativação do fator de transcrição NF-KB durante o desenvolvimento de cancro do colo-do-útero (Nair *et al*, 2003; Prusty *et al*, 2005).

Outro ponto a considerar seria o facto do miR-146a apresentar funções pró-proliferativas, mas anti-metastáticas. Um estudo demonstrou que PDZD2, um dos alvos do miR-146a, encontra-se envolvido na aderência celular. A proteína PDZD2 contém um domínio PDZ, um componente que faz parte de complexos de adesão celular. Como miR-146a exerce controlo pós-transcricional negativo sobre este domínio PDZ, a diminuição do miR-146a permite uma menor aderência celular, promovendo a metastização (Greco *et al*, 2011). O NF-KB pode atuar como oncogene através da sua capacidade para estimular a inflamação e considerando a ligação funcional entre o NF-KB e o miR-146a e os resultados obtidos para a expressão do miR-146a em CIS, é possível que o miR-146a atue como um elo de ligação importante entre a inflamação provocada pela infeção com HPV e o desenvolvimento tumoral.

O fato de termos observado maior expressão durante fases de hiperplasia e displasia e menor expressão durante CIS leva a acreditar que este miRNA sofra expressão diferencial ao longo do desenvolvimento tumoral. Para a análise da expressão do miR-146a em CIS foi utilizada pele de orelha devido ao facto de não ter sido obtido nenhum caso de CIS em pele de peito.

2. Efeito de fármacos anti-inflamatórios

A inflamação é um componente importante na progressão tumoral uma vez que muitos cancro tem origem em locais de infeção e inflamação (Rakoff-Nahoum, 2006). A inflamação está presente nas diferentes etapas da carcinogénese e assume mecanismos diversos dependendo do tipo e frequência de estímulos recebidos. Nas etapas iniciais da carcinogénese a inflamação pode combater e até eliminar células transformadas, no entanto, a inflamação crónica, muitas vezes citotóxica, é um dos fatores de progressão importantes na história natural de muitas neoplasias (Grivennikov *et al.*, 2010). Muitas vezes, principalmente após formada uma massa tumoral, existem células que escapam aos mecanismos de imunovigilância, observando-se que o microambiente tumoral é capaz de regular respostas inflamatórias, colaborando para a progressão tumoral (Whiteside, 2008).

2.1 Efeito do celecoxib sobre a expressão do miR-146a

O celecoxib foi o primeiro inibidor específico da COX-2 aprovado para o alívio de osteoartrite e dor de artrite reumatoide (Davies *et al.*, 2000). Também tem mostrado ser eficaz na redução de pólipos em pacientes com polipose adenomatosa familiar (Steinbach *et al.*, 2000). O celecoxib tem se mostrado benéfico na prevenção do cancro, uma vez que também tem propriedades pró-apoptóticas, anti-angiogénicas e anti-neoplásicas (Masferrer *et al.*, 2000; Chow *et al.*, 2005). A sobre-expressão aberrante da COX-2 por si só não é capaz de iniciação tumoral mas tem sido associada com a alterações pré-malignas em tecidos epiteliais e já foi reportada numa variedade de cancros, incluindo o cancro colo-rectal, o cancro do pulmão, gástrico, mama, próstata, bexiga e colo-do-útero (Fosslien, 2000; Howe *et al.*, 2001; Kulkarni *et al.*, 2001; Turini e Dubois, 2002; Fürstenberger *et al.*, 2006). Além de causar inflamação crónica sabe-se que produtos da COX, especialmente a prostaglandina E_2 (PGE_2), são de interferir com atividade anti-tumoral do sistema imune. A PGE_2 inibe a produção de citocinas anti-tumorais T_H1 pelos linfócitos T e inibe as funções anti-tumorais de células NK (Natural Killer) e macrófagos (Fürstenberger *et al.*, 2006). Um estudo realizado em murganhos que sobre-expressam COX-2 em queratinócitos desenvolveram hiperplasia e displasia, implicando uma ligação entre a expressão de COX-2 e o desenvolvimento de lesões pré-malignas (Liu *et al.*, 2001).

Recentemente, o nosso grupo demonstrou, usando este mesmo modelo animal, que o celecoxib promove a desgranulação das células T citotóxicas em lesões induzidas pelo HPV16 (Santos *et al.*, 2015).

Anti-inflamatórios não esteroides (AINES), como o celecoxib, encontram-se entre os fármacos mais prescritos a nível mundial, estando descritos como anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos. Ainda não se sabe ao certo de que forma é que o celecoxib atua ao nível do tratamento de neoplasias, no entanto, sabe-se, que pode atuar através de mecanismos dependentes e independentes da COX (Lampiasi *et al.*, 2012). No entanto, sabe-se que a inibição da ciclooxigenase provoca a diminuição de prostaglandinas e outros prostanóides levando à diminuição da proliferação celular (Nakanishi *et al.*, 2013).

Vários estudos suportam a atividade anti-neoplásica d, especificamente do celecoxib. Contudo, é de salientar que nem toda a atividade anti-neoplásica associada ao celecoxib se deve à inibição da enzima COX. Vários estudos demonstraram a existência de mecanismos independentes de COX-2. Os efeitos anti-neoplásicos obtidos em concentrações superiores de celecoxib do que a necessária para inibir a síntese de prostaglandinas e o facto de ocorrer inibição da proliferação celular em células desprovidas de COX-2 suportam a existência de um mecanismo independente de COX-2. Um estudo de Cervello *et al.* apoia a existência de um mecanismo independente de COX-2 para celecoxib e propõe ainda um papel como inibidor de atividade de NF-KB (Cervello *et al.*, 2011).

Um estudo recente identificou o miR-146a como um regulador da COX-2 em cancro do pulmão. Em células de cancro do pulmão, na ausência de miR-146a, a COX-2 torna-se sobre-expressa e a introdução do microRNA resultou na redução de libertação de prostaglandinas. Estes efeitos biológicos são devidos especificamente à regulação da COX-2 pelo miR-146a (Cornett *et al.*, 2014). Outro estudo confirma o papel funcional do miR-146a como regulador da COX-2 ao demonstrar que o miR-146a se liga à região 3'UTR do mRNA da COX-2 (Sato *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram um aumento significativo na expressão do miR-146a em murganhos transgénicos tratados com celecoxib em comparação com murganhos transgénicos que não receberam tratamento.

2.2 Efeito do DMAPT sobre a expressão do miR-146a

O DMAPT (Di-metilaminopartenólido) é um fármaco recente, hidrossolúvel e administrado pela via oral criado como análogo do partenólídeo, um composto já testado com grande eficácia no tratamento de neoplasias, mas de uso farmacológico difícil por ser pouco solúvel (Curry *et al.*, 2004).

O DMAPT tem se mostrado eficaz na erradicação de células estaminais leucêmicas. Um estudo realizado em leucemia mieloide aguda demonstrou utilizando inibidores de NF- κ B em células CD34⁺CD38⁻, o DMAPT atuou apenas sobre células tronco leucêmicas, poupando as células tronco hematopoiéticas normais. Esta observação *in vitro* foi verificada também *in vivo* em murganhos. O tratamento com DMAPT em animais previamente enxertados com células de leucemia mieloide aguda resultou na redução no número de blastos, reduzindo a capacidade do enxerto tumoral de ser transplantado para um recetor secundário. Os blastos provenientes dos murganhos tratados com DMAPT apresentaram inibição substancial de NF- κ B (Guzman *et al.*, 2007). Outro artigo realizado em murganhos afirma que o DMAPT foi eficaz na redução do crescimento de xenotransplantes derivados de células de carcinoma mamário e aumentou significativamente a sobrevivência dos murganhos tratados. Neste mesmo estudo verificaram, através de imunohistoquímica, que DMAPT diminui a expressão do componente p65 do fator de transcrição NF- κ B (D'Anneo *et al.*, 2013). Este fármaco também já foi testado *in vivo* em cancro da próstata, cancro do pulmão e bexiga onde confirmaram a sua ação de inibição do NF- κ B (Shanmugam *et al.*, 2010; Shanmugam *et al.*, 2011).

O NF- κ B tem sido considerado um fator de transcrição anti-apoptótico por ser capaz de regular a transcrição de genes que controlam a proliferação celular bem como a sobrevivência. A ativação do NF- κ B é um mecanismo usado por células pré-malignas uma vez que pode bloquear a apoptose através da regulação de proteínas anti-apoptóticas e ainda induzir a expressão de citocinas mantendo assim um estado inflamatório propício para iniciação da carcinogénese.

Os dados obtidos neste trabalho demonstraram um aumento da expressão do miR-146a em murganhos transgênicos tratados com DMAPT ($p=0,036$) em relação a murganhos transgênicos que não receberam tratamento, sugerindo o

efeito pretendido pela administração do fármaco. É possível que o DMAPT atue em algum ponto da via do NF-KB, além da sua ação direta sobre p65, promovendo a expressão do mir-146a para exercer a sua função como inibidor fator de transcrição NF-KB. A diminuição da ativação do NF-KB, que advém da administração do DMAPT e aumento da expressão do miR-146, provoca a diminuição da expressão de fatores potenciadores da progressão tumoral.

3. Discussão geral

Os dados que obtivemos na comparação da expressão do miR-146a entre murganhos transgênicos e wild-type sugerem que o existe sobre-expressão significativa do mir-146a em murganhos transgênicos e que essa sobre-expressão acompanha a progressão das lesões nas fases iniciais da carcinogénese.

Considerando o papel que o miR-146a desempenha na regulação de inflamação, esta tendência para o aumento da expressão do miR-146a ao longo das etapas da carcinogénese sugere que em etapas iniciais da carcinogénese ocorra uma sobre-expressão deste microRNA na tentativa de contrariar a inflamação.

O facto do celecoxib ser um fármaco anti-inflamatório e incluindo o fato de que o miR-146a ser capaz de regular negativamente a COX-2, que é o principal alvo do celecoxib torna possível que o miR-146a atue no sentido de diminuir a inflamação. De igual forma, a administração de DMAPT poderá ter potenciado a inibição do NF-KB pelo mir-146a resultando no aumento de expressão obtido.

Estes resultados sugerem que, apesar das funções já conhecidas do miR-146 no controlo de inflamação e resposta imune e o seu papel em diversas vias de sinalização celular, este poderá também estar relacionado com a indução de um microambiente mais favorável para a carcinogénese induzida por HPV.

Capítulo VI:

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Os miRNAs constituem uma área em expansão e de destaque no cenário científico atual. Sabe-se que a expressão de microRNAs é alterada durante a progressão de vários câncros humanos. Alguns microRNAs são especificamente expressos em câncer do colo-do-útero e têm a sua expressão aumentada de forma aberrante e o miR-146a faz parte de um extenso número de microRNAs que está desregulado em neoplasias.

O aumento no número de estudos sobre o papel de microRNAs na carcinogênese tem contribuído significativamente para a compreensão atual da biologia do câncer. A descrição detalhada do papel de miRNAs específicos pode auxiliar na identificação de interações entre miRNAs virais e celulares e na compreensão de patogênese do câncer do colo-do-útero.

O presente estudo foi proposto com o objetivo de investigar a influência do HPV16 na expressão do miR-146a. Embora muitos estudos já tenham sido realizados sobre microRNAs e câncer do colo-do-útero, não se encontram esclarecidas as redes de interação que influenciam o papel do HPV16 na expressão do miR-146a.

Durante o desenvolvimento deste estudo foi investigado o efeito da expressão do miR-146a sob o efeito de químicos anti-inflamatórios. Apesar dos bons resultados alcançados pelo celecoxib, a forma como este fármaco atua no tratamento de neoplasias ainda é pouco compreendida, levando à necessidade de se realizarem mais estudos. Estudos sobre as vias de sinalização celular nas quais a COX-2 atua poderão contribuir para a descoberta ou aperfeiçoamento de fármacos capazes de inibir a proliferação de células neoplásicas.

Com base nos resultados obtidos, acreditamos que este miR-146a deve exercer um papel importante na regulação de genes associados ao desenvolvimento de câncer do colo-do-útero e o seu estudo aprofundado pode contribuir para uma melhor compreensão do seu papel na carcinogênese.

Estudos futuros poderão comprovar a associação entre o perfil de expressão do miR-146a e as alterações a nível imunitário, por exemplo, através de estudos de quantificação de algumas citocinas inflamatórias. A análise de

expressão do miR-146a em outros locais anatómicos, como cavidade oral poderá também ajudar a compreender melhor este processo.

Capítulo VII:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aggarwal, B. B., Shishodia, S., Sandur, S. K., *et al.* (2006). Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 72(11): 1605-1621.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Cancer as a microevolutionary process. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition.

Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., *et al.* (2008). Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research* 25(9): 2097-2116.

Arbeit, J. M., Munger, K., Howley, P. M., and Hanahan, D. (1994) Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *J. Virol.* 68, 4358–4368

Baltimore, D., Boldin, M. P., O'Connell, R. M., Rao, D. S., & Taganov, K. D. (2008). MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nature immunology*, 9(8), 839-845.

Baker, T. S., W. W. Newcomb, N. H. Olson, L. M. Cowser, C. Olson, and J. C. Brown. (1991) Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.* 60:1445–1456.

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116(2), 281-297

Beasley, R. P., Lin, C. C., Hwang, L. Y., & Chien, C. S. (1981). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22 707 men in Taiwan. *The Lancet*, 318(8256), 1129-1133.

Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., & de Villiers, E. M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401(1), 70-79.

Bittner, J. J. (1936). Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science*, 84(2172), 162-162.

Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., & Zur Hausen, H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *The EMBO journal*, 3(5), 1151.

Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., ... & Coglian, V. (2009). A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *The lancet oncology*, 10(4), 321-322.

Buck, C. B., Day, P. M., & Trus, B. L. (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, 445(1), 169-174.

Burd, E. M. (2003). Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical microbiology reviews*, 16(1), 1-17.

Brake T, Connor JP, Petereit DG, Lambert PF (2003) Comparative analysis of cervical cancer in women and in a human papillomavirus-transgenic mouse model: identification of minichromosome maintenance protein 7 as a informative biomarker for human cervical cancer. *Cancer Res* 63: 8173–8180.

Cai, X., Hagedorn, C. H., & Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*, 10(12), 1957-1966.

Calin G.A., Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, *et al.* (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*;99(24):15524-9.

Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 6(11), 857-866.

Canadas, M. P., Darwich, L., Sirera, G., Cirigliano, V., Bofill, M., Clotet, B., & Videla, S. (2010). New molecular method for the detection of human papillomavirus type 16 integration. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(7), 836-842.

Castellsagué, X., & Muñoz, N. (2003). Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 31, 20-8.

Cervello, M., Bachvarov, D., Cusimano, A., Sardina, F., Azzolina, A., Lampiasi, N., ... & Montalto, G. (2011). COX-2-dependent and COX-2-independent mode of action of celecoxib in human liver cancer cells. *Omics: a journal of integrative biology*, 15(6), 383-392.

Chelimo, C., Wouldes, T. A., Cameron, L. D., & Elwood, J. M. (2013). Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *Journal of Infection*, 66(3), 207-217.

Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., & Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051), 740-744.

Cooper, G. M. (2000). The development and causes of cancer. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition.

Coussens, L. M., Hanahan, D., and Arbeit, J. M. (1996) Genetic predisposition and parameters of malignant progression in K14-HPV16 transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 149, 1899-1917

Coussens, L. M., Raymond, W. W., Bergers, G., Laig-Webster, M., Behrendtsen, O., Werb, Z., ... & Hanahan, D. (1999). Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes & development*, 13(11), 1382-1397.

Coussens, L. M., Tinkle, C. L., Hanahan, D., & Werb, Z. (2000). MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*, 103(3), 481-490.

Cornett, A. L., & Lutz, C. S. (2014). Regulation of COX-2 expression by miR-146a in lung cancer cells. *RNA*, 20(9), 1419-1430.

Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L. T., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., & Simmons, D. L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13926-13931.

Chen, C. J., Hsu, W. L., Yang, H. I., Lee, M. H., Chen, H. C., Chien, Y. C., & You, S. L. (2014). Epidemiology of virus infection and human cancer. In *Viruses and Human Cancer* (pp. 11-32). Springer Berlin Heidelberg.

Chow, L.W., Loo, W.T., Toi, M., (2005) Current directions for COX-2 inhibition in breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* 59, S281–S284.

Curry Iii, E. A., Murry, D. J., Yoder, C., Fife, K., Armstrong, V., Nakshatri, H., ... & Sweeney, C. J. (2004). Phase I dose escalation trial of feverfew with standardized doses of parthenolide in patients with cancer. *Investigational new drugs*, 22(3), 299-305.

Crusius, K., Auvinen, E., & Alonso, A. (1997). Enhancement of EGF-and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene*, 15(12), 1437-1444.

D'anneo, A., Carlisi, D., Lauricella, M., Puleio, R., Martinez, R., Di Bella, S., ... & Vento, R. (2013). Parthenolide generates reactive oxygen species and autophagy in MDA-MB231 cells. A soluble parthenolide analogue inhibits tumour growth and metastasis in a xenograft model of breast cancer. *Cell death & disease*, 4(10), e891.

Day, P. M., Roden, R. B., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *Journal of virology*, 72(1), 142-150.

Davies, N.M., McLachlan, A.J., Day, R.O., Williams, K.M., (2000) Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Clin. Pharmacokinet.* 38, 225–242.

De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17-27.

Dias, F., Teixeira, A. L., Santos, J. I., Gomes, M., Nogueira, A., Assis, J., & Medeiros, R. (2013). Renal cell carcinoma development and miRNAs: a possible link to the EGFR pathway. *Pharmacogenomics*, 14(14), 1793-1803.

Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science*, 110(5), 525-541.

Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30, F55-F70.

Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., & Murakami, I. (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in medical virology*, 25(S1), 2-23.

Dürst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., & Zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(12), 3812-3815.

Elson DA, Riley RR, Lacey A, Thordarson G, Talamantes FJ, et al. (2000) Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. *Cancer Res* 60: 1267-1275.

Favre, M. (1975) Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. *J. Virol.* 15:1239-1247.

Feng, Y., Zhang, X., Graves, P., & Zeng, Y. (2012). A comprehensive analysis of precursor microRNA cleavage by human Dicer. *Rna*, 18(11), 2083-2092.

Fosslien, E. (2000). Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 30(1): 3-21.

Fürstenberger, G., Krieg, P., Müller-Decker, K., & Habenicht, A. J. R. (2006). What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis?. *International journal of cancer*, 119(10), 2247-2254.

Galasso, M., Sandhu, S. K., & Volinia, S. (2012). MicroRNA expression signatures in solid malignancies. *The Cancer Journal*, 18(3), 238-243.

Garofalo M, Croce CM.(2011) microRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annual review of pharmacology and toxicology*.;51:25-43.

Gocze, K., Gombos, K., Juhasz, K., Kovacs, K., Kajtar, B., Benczik, M., ... & Ember, I. (2013). Unique microRNA expression profiles in cervical cancer. *Anticancer research*, 33(6), 2561-2567.

Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123(4), 631-640.

Guzman, M. L., Rossi, R. M., Neelakantan, S., Li, X., Corbett, C. A., Hassane, D. C., ... & Vaughan, A. (2007). An orally bioavailable parthenolide analog selectively eradicates acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood*, 110(13), 4427-4435.

Greco, D., Kivi, N., Qian, K., Leivonen, S. K., Auvinen, P., & Auvinen, E. (2011). Human papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs. *PloS one*, 6(7), e21646.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.

Halvorsen, E.C., S.M. Mahmoud, and K.L. Bennewith, (2014) Emerging roles of regulatory T cells in tumour progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*

Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development*, 18(24), 3016-3027.

He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, *et al.* (2005) The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 19075–19080.

He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 522-531.

Herber R, Liem A, Pitot H, Lambert PF (1996) Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J Virol* 70: 1873–1881.

Holowaty, P., A. B. Miller, T. Rohan, and T. To. (1999) Natural dysplasia of the uterine cervix. *J. Natl. Cancer Inst.* 91:252–258

Hou Z, Xie L, Yu L, Qian X, Liu B (2011) MicroRNA-146a is down-regulated in gastric cancer and regulates cell proliferation and apoptosis. *Med Oncol*.

Howe, L. R., Subbaramaiah, K., Brown, A. M., *et al.* (2001). Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 8(2): 97- 114.

Iorio, M. V., & Croce, C. M. (2012). Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 18(3), 215.

Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115(2), 209-216.

Kogo R, Mimori K, Tanaka F, Komune S, Mori M (2011) Clinical significance of miR-146a in gastric cancer cases. *Clin Cancer Res* 17: 4277–4284.

Kulkarni, S., Rader, J. S., Zhang, F., Liapis, H., Koki, A. T., Masferrer, J. L., ... & Dannenberg, A. J. (2001). Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clinical Cancer Research*, 7(2), 429-434.

Lambert, P. F., Pan, H., Pitot, H. C., Liem, A., Jackson, M., & Griep, A. E. (1993). Epidermal cancer associated with expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes in the skin of transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(12), 5583-5587.

Lampiasi, N., Azzolina, A., Umezawa, K., Montalto, G., McCubrey, J. A., & Cervello, M. (2012). The novel NF- κ B inhibitor DHMEQ synergizes with celecoxib to exert antitumor effects on human liver cancer cells by a ROS-dependent mechanism. *Cancer letters*, 322(1), 35-44.

Leder, A., Kuo, A., Cardiff, R. D., Sinn, E., & Leder, P. (1990). v-Ha-ras transgene abrogates the initiation step in mouse skin tumorigenesis: effects of phorbol esters and retinoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(23), 9178-9182.

Lee, J. W., Choi, C. H., Choi, J. J., Park, Y. A., Kim, S. J., Hwang, S. Y., ... & Bae, D. S. (2008). Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 14(9), 2535-2542.

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20), 4051-4060.

Lin, P. Y., Yu, S. L., & Yang, P. C. (2010). MicroRNA in lung cancer. *British journal of cancer*, 103(8), 1144-1148.

Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY (2008) Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA* 14: 417-424.

Li Y, Vandenboom TG 2nd, Wang Z, Kong D, Ali S, *et al.* (2010) miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 70: 1486-1495.

Liu CH, Chang SH, Narko K, *et al* (2001) Overexpression of COX-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 276:18563-18569

Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., ... & Downing, J. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *nature*, 435(7043), 834-838.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436-444.

Ma, R., Jiang, T., & Kang, X. (2012). Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 31(1)

Martinez, I., Gardiner, A. S., Board, K. F., Monzon, F. A., Edwards, R. P., & Khan, S. A. (2008). Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells. *Oncogene*, 27(18), 2575-2582.

Masferrer, J.L., Leahy, K.M., Koki, A.T., Zweifel, B.S., Settle, S.L., Woerner, B.M., Edwards, D.A., Flickinger, A.G., Moore, R.J., Seibert, K., (2000) Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res.* 60, 1306-1311.

Ma, X., Buscaglia, L. E. B., Barker, J. R., & Li, Y. (2011). MicroRNAs in NF- κ B signaling. *Journal of molecular cell biology*, 3(3), 159-166.

Melar-New, M., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomaviruses modulate expression of microRNA 203 upon epithelial differentiation to control levels of p63 proteins. *Journal of virology*, 84(10), 5212-5221.

Meltzer, P. S. (2005). Cancer genomics: small RNAs with big impacts. *Nature*, 435(7043), 745-746.

Muñoz, N., & Bosch, F. X. (1997). Cervical cancer and human papillomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud pública de México*, 39(4), 274-282.

Nair, A., Venkatraman, M., Maliekal, T. T., Nair, B., & Karunagaran, D. (2003). NF- κ B is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix. *Oncogene*, 22(1), 50-58.

Nakanishi, M., & Rosenberg, D. W. (2013, March). Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 35, No. 2, pp. 123-137). Springer-Verlag.

Pacifico F, Crescenzi E, Mellone S, Iannetti A, Porrino N, *et al.* (2010) mNuclear factor- κ B contributes to anaplastic thyroid carcinomas through upregulation of miR-146a. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 1421–1430.

Paiva, I., da Costa, R. M. G., Ribeiro, J., Sousa, H., Bastos, M., Rocha, A. F. C., ... & Medeiros, R. (2015). A role for microRNA-155 expression in microenvironment associated to HPV-induced carcinogenesis in K14-HPV16 transgenic mice. *PloS one*, 10(1), e0116868.

Parkin, D. M., & Bray, F. (2006). The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, 24, S11-S25.

Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D., & Gallo, R. C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(12), 7415-7419.

Prusty, B. K., Husain, S. A., & Das, B. C. (2005). Constitutive activation of nuclear factor- κ B: preferential homodimerization of p50 subunits in cervical carcinoma. *Front Biosci*, 10(5), 1510-1519.

Rao, P., & Knaus, E. E. (2008). Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 11(2), 81-110s.

Rakoff-Nahoum, S. (2006). Why cancer and inflammation. *Yale J Biol Med*, 79(3-4), 123-30.

Ribeiro, J., & Sousa, H. (2014). MicroRNAs as biomarkers of cervical cancer development: a literature review on miR-125b and miR-34a. *Molecular biology reports*, 41(3), 1525-1531.

Riley RR, Duensing S, Brake T, Munger K, Lambert PF, *et al.* (2003) Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res* 63: 4862-4871.

Rhyasen, G. W.,e Starczynowski, D. T. (2015). IRAK signalling in cancer. *British journal of cancer*, 112(2), 232-237.

Roccio, M., Dal Bello, B., Gardella, B., Carrara, M., Gulminetti, R., Mariani, B., & Spinillo, A. (2012). HPV Infection and Intraepithelial Lesions: Comparison Between HIVPositive and Negative Women. *Current HIV research*, 10(7), 614-619.

Rous, P. (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *The Journal of experimental medicine*, 13(4), 397-411.

Rusca, N., e Monticelli, S. (2011). MiR-146a in immunity and disease. *Molecular biology international*, 2011.

Santos, C. E. R. (2015). Modulating The CD8+ T Cell Response in Human Papillomavirus-Induced Lesions: Studies in The K14-HPV16 Transgenic Mouse Model.

Sato, T., Liu, X., Nelson, A., Nakanishi, M., Kanaji, N., Wang, X., ... & Patil, A. (2010). Reduced miR-146a increases prostaglandin E2 in chronic obstructive pulmonary disease fibroblasts. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 182(8), 1020-1029.

Saslow, D., Castle, P. E., Cox, J. T., Davey, D. D., Einstein, M. H., Ferris, D. G., ... & Noller, K. L. (2007). American Cancer Society Guideline for human papillomavirus (HPV) vaccine use to prevent cervical cancer and its precursors. *CA: a cancer journal for clinicians*, 57(1), 7-28

Sassen, S., Miska, E. A., & Caldas, C. (2008). MicroRNA—implications for cancer. *Virchows Archiv*, 452(1), 1-10.

Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C., & Wacholder, S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 370(9590), 890-907.

Scapoli L, Palmieri A, Lo Muzio L, Pezzetti F, Rubini C, *et al.* (2010) MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression. *Int J Immunopathol Pharmacol* 23: 1229-1234.

Shanmugam, R., Kusumanchi, P., Cheng, L., Crooks, P., Neelakantan, S., Matthews, W., ... & Sweeney, C. J. (2010). A water-soluble parthenolide analogue suppresses in vivo prostate cancer growth by targeting NFκB and generating reactive oxygen species. *The Prostate*, 70(10), 1074-1086.

Shanmugam, R., Kusumanchi, P., Appaiah, H., Cheng, L., Crooks, P., Neelakantan, S., ... & Sweeney, C. J. (2011). A water soluble parthenolide analog suppresses in vivo tumor growth of two tobacco-associated cancers, lung and bladder cancer, by targeting NF-κB and generating reactive oxygen species. *International journal of cancer*, 128(10), 2481-2494.

Shope, R. E., & Hurst, E. W. (1933). Infectious papillomatosis of rabbits with a note on the histopathology. *The Journal of experimental medicine*, 58(5), 607-624.

Smith, J. S., Lindsay, L., Hoots, B., Keys, J., Franceschi, S., Winer, R., & Clifford, G. M. (2007). Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *International journal of cancer*, 121(3), 621-632.

Smith-McCune, K., Zhu, Y. H., Hanahan, D., & Arbeit, J. (1997). Cross-species comparison of angiogenesis during the premalignant stages of squamous carcinogenesis in the human cervix and K14-HPV16 transgenic mice. *Cancer research*, 57(7), 1294-1300.

Song S, Pitot HC, Lambert PF (1999) The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol* 73: 5887-5893.

Soon, P., & Kiaris, H. (2013). MicroRNAs in the tumour microenvironment: big role for small players. *Endocrine-related cancer*, 20(5), R257-R267.

Stanley, M. (2006). Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*, 24, S16-S22.

Steinbach, G., Lynch, P.M., Phillips, R.K., Wallace, M.H & ... (2000) The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N. Engl. J. Med.* 342, 1946-1952.

Turini, M. E.e DuBois, R. N. (2002). "Cyclooxygenase-2: a therapeutic target." *Annu Rev Med* 53: 35-57

van Schooneveld, E., Wildiers, H., Vergote, I., Vermeulen, P. B., Dirix, L. Y., & Van Laere, S. J. (2015). Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. *Breast Cancer Research*, 17(1), 1.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*, 17(24), 3011-3016.

Yoshida, M., Miyoshi, I., & Hinuma, Y. (1982). Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(6), 2031-2035.

zur Hausen, H. (2009). The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology*, 392(1), 1-10.

Wang X, Tang S, Le S-Y, Lu R, Rader JS, *et al.* (2008) Aberrant Expression of Oncogenic and Tumor-Suppressive MicroRNAs in Cervical Cancer Is Required for Cancer Cell Growth. *PLoS ONE* 3(7): e2557. doi:10.1371/journal.pone.0002557

Whiteside, T. L. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27(45), 5904-5912.

Wong, L., Lee, K., Russell, I., & Chen, C. (2007). Endogenous controls for real-time quantitation of miRNA using TaqMan® microRNA assays. *Applied Biosystems Application Note*, P11-01.

World Health Organization. (1969). Histopathological definition of Burkitt's tumour. *Bulletin of the World Health Organization (WHO)*, 40(4), 601-7.

Zheng ZM, Baker CC. (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and posttranscriptional regulation. *Frontiers in Bioscience*; 11: 2286-2302